

MARCO AURÉLIO RAEDER DA COSTA

**GLUTAMINA ORAL NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Cirúrgica .

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2002

Costa, Marco Aurélio Raeder da

Glutamina oral na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos/
Marco Aurélio Raeder da Costa. - Curitiba, 2002.

74 f.:il

Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

1. Glutamina. 2. Anastomose cirúrgica - cólon - cicatrização de
feridas.

A Deus, por me capacitar e permitir
que eu me tornasse médico.

Aos meus pais, pelo encorajamento,
educação, incentivo constante e apoio
incondicional para que eu pudesse
chegar até aqui.

À Sumaya, minha esposa, pelo grande
apoio, paciência e compreensão,
principalmente nos momentos mais
difíceis.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Professor Titular do Departamento de Cirurgia e Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, orientador desta dissertação, pela fundamental participação e dedicação; o que tornou possível a realização do trabalho e pela importante contribuição na minha formação profissional e acadêmica.

Ao Prof. Dr. Julio Cezar Uili Coelho, Professor Titular e Chefe dos Serviços de Cirurgia do Aparelho Digestivo e de Transplante de Fígado da Universidade Federal do Paraná, Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Nossa Sra. das Graças, a quem considero mentor e cujo caráter, disposição, conhecimento técnico-científico e sabedoria pautam minha vida.

Aos acadêmicos de Medicina da Universidade Federal do Paraná: Cesar Giovani Conte, João Vieira, André Martins de Barros, Helim Minoru Matsumoto, Igor Rafael Sincos e Sérgio Quilici Belczak pelo importante auxílio durante a fase experimental.

Ao Dr. Sérgio Ossamu Ioshi, patologista do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição na avaliação de parte dos estudos histológicos deste trabalho.

Aos Drs. Paulo Cesar Andriguetto, Renato Valmassoni Pinho, Fernando Hintz Greca, Carlos Augusto de Mendonça Gondin, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas, Cláudio Pozzobon e Júlio Cesar Wiederkehr, cirurgiões do Hospital Nossa Senhora

das Graças, pela amizade, incentivo e ensinamentos recebidos durante minha formação profissional.

Ao Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Paraná e ao técnico Elson Dias de França pela colaboração durante a fase experimental do trabalho.

Ao LACTEC, na pessoa do seu diretor, engenheiro Henrique José Ternes Neto, ao engenheiro Sérgio Luiz Henke, responsável pelo departamento de materiais e ao técnico Sérgio Weckerlin Santos pela paciência e colaboração durante os testes com os corpos de prova.

Às funcionárias do programa de pós-graduação Edilaine Araújo dos Santos e Marlei Benedita Vieira Ribeiro pelo auxílio logístico na elaboração deste trabalho.

À Ajinomoto Interamericana do Brasil, pela doação dos aminoácidos utilizados.

À Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar meus cursos de graduação e de pós-graduação.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa e pelo incentivo à pesquisa em nosso país.

*“Que o alimento seja seu medicamento
e que o medicamento seja seu
alimento” Hipócrates 400 a.C.*

SUMÁRIO

	LISTA DE GRÁFICOS.....	ix
	LISTA DE TABELAS E QUADROS.....	x
	LISTA DE FIGURAS.....	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
	RESUMO.....	xv
	ABSTRACT.....	xvi
1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	OBJETIVO.....	4
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1	CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS CIRÚRGICAS.....	6
2.2	O AMINOÁCIDO GLUTAMINA.....	8
2.2.1	A Suplementação de Glutamina em Estudos Experimentais.....	10
2.2.2	Efeitos da Glutamina Sobre a Cicatrização Intestinal e de Anastomoses Colônicas.....	12
2.3	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES INTESTINAIS.....	14
2.3.1	Parâmetros Clínicos.....	14
2.3.1.1	Peso.....	15
2.3.1.2	Incidência de Óbitos.....	16
2.3.1.3	Aderências Intra-Abdominais.....	16
2.3.2	Métodos Mecânicos.....	17
2.3.2.1	Pressão de Ruptura.....	18
2.3.2.2	Força Tênsil de Ruptura.....	19
2.3.3	Método Histológico.....	21

3	MATERIAL E MÉTODO	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Animais.....	24
3.1.2	Aminoácidos.....	24
3.2	MÉTODO	25
3.2.1	Grupos de Estudo.....	25
3.2.2	Procedimento Cirúrgico.....	26
3.2.3	Pós-Operatório.....	27
3.2.4	Morte dos Animais.....	27
3.2.5	Dados Avaliados.....	28
3.2.5.1	Peso.....	28
3.2.5.2	Ingesta Alimentar Média.....	29
3.2.5.3	Incidência de Óbitos.....	30
3.2.5.4	Aderências Intra-Abdominais.....	30
3.2.5.5	Força Tênsil de Ruptura da Anastomose Colônica.....	30
3.2.5.6	Avaliação Histológica.....	33
3.2.6	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	38
4.1	PESO	38
4.1.1	Variação de Peso.....	39
4.2	INGESTA ALIMENTAR	40
4.3	ADERÊNCIAS INTRA-ABDOMINAIS	42
4.4	FORÇA TÊNSIL DE RUPTURA	42
4.5	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	44
4.5.1	Coloração de Hematoxilina-Eosina.....	44
4.5.2	Densitometria do Colágeno.....	47

5	DISCUSSÃO.....	51
5.1	Modelo Experimental.....	51
5.2	Utilização da Glutamina.....	53
5.3	Avaliação da Cicatrização de Anastomoses Intestinais.....	56
5.4	Força Tênsil de Ruptura.....	54
5.5	Avaliação Histológica.....	61
6	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXO.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	EVOLUÇÃO DA INGESTA ALIMENTAR MÉDIA (IAM) DOS SUBGRUPOS GLY 3, GLN 3, GLY 8 E GLN 8 DURANTE O EXPERIMENTO.....	41
GRÁFICO 2	VALORES DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS.....	44
GRÁFICO 3	VALORES DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS.....	44
GRÁFICO 4	VALORES DAS ÁREAS ANASTOMÓTICAS PERCENTUAIS OCUPADAS PELO COLÁGENO TIPO I NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS.....	49
GRÁFICO 5	VALORES DAS ÁREAS ANASTOMÓTICAS PERCENTUAIS OCUPADAS PELO COLÁGENO TIPO III NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS.....	49

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1	COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS.....	29
QUADRO 2	ÍNDICE DE ADERÊNCIAS DE KNIGHTLY.....	30
QUADRO 3	CLASSIFICAÇÃO E ATRIBUIÇÃO DE ÍNDICES AOS ACHADOS HISTOLÓGICOS DE HEMATOXILINA- EOSINA.....	34
TABELA 1	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INDEPENDÊNCIA ENTRE OS SUBGRUPOS GLICINA E GLUTAMINA COM RELAÇÃO À RUPTURA DO CORPO DE PROVA FORA DA LINHA DA ANASTOMOSE.....	38
TABELA 2	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DOS PESOS DOS GRUPOS GLICINA E GLUTAMINA NOS DIAS INICIAL, DA OPERAÇÃO E DA MORTE.....	39
TABELA 3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DE PESO ENTRE OS DIAS DA OPERAÇÃO E INICIAL (DPOI) ENTRE OS SUBGRUPOS.....	40
TABELA 4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DE PESO ENTRE OS DIAS DA MORTE E DA OPERAÇÃO (DPMO) ENTRE OS SUBGRUPOS.....	40
TABELA 5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS VALORES DA INGESTA ALIMENTAR MÉDIA (IAM) DURANTE O PERÍODO PÓS- OPERATÓRIO NOS SUBGRUPOS.....	41
TABELA 6	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES DE ADERÊNCIA INTRA-ABDOMINAL NOS SUBGRUPOS.....	42
TABELA 7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) DAS ANASTOMOSES NOS GRUPOS CONTROLE, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS.....	43
TABELA 8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES HISTOLÓGICOS (HE) DE PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS.....	45

TABELA 9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES HISTOLÓGICOS (HE) DE PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS.....	46
TABELA 10	ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA ÁREA PERCENTUAL OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPO I E III NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS.....	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ADMINISTRAÇÃO DE AMINOÁCIDO POR Sonda OROGÁSTRICA APÓS SEDAÇÃO COM ÉTER.....	25
FIGURA 2	ASPECTO DO CÓLON APÓS A REALIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES PROXIMAL (A) E DISTAL (B).....	27
FIGURA 3	SEGMENTO COLÔNICO CONTENDO A ANASTOMOSE EM SUA PORÇÃO MÉDIA.....	28
FIGURA 4	MÁQUINA DE TRAÇÃO COMPUTADORIZADA – INSTRON 4467.....	31
FIGURA 5	ESTUDO DA TRAÇÃO EM CORPO DE PROVA CONTENDO A ANASTOMOSE COLÔNICA EM SUA PORÇÃO MÉDIA.....	32
FIGURA 6	FOTOMICROGRAFIA CORADA POR PICROSIRIUS-RED (400x) ILUSTRANDO OS DOIS TIPOS DE COLÁGENO AVALIADOS: TIPO I (B) E TIPO III (A).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	- Aminoácido
C ₁₄	- Carbono 14
cGy	- Centigray (rad)
cm	- Centímetro
CO ₂	- Dióxido de Carbono
d	- Dia
D	- Dalton
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EP	- Desvio padrão
DPMI	- Diferença de peso entre os dias de Morte e Inicial
DPMO	- Diferença de peso entre os dias de Morte e da Operação
DPOI	- Diferença de peso entre os dias de Operação e inicial
et al	- e colaboradores
FMT	- Força Máxima de Tração
FRT	- Força de Ruptura Total
g	- Grama
GLN	- Grupo Glutamina
GLN 3	- Subgrupo Glutamina morto no terceiro dia de pós-operatório
GLN 8	- Subgrupo Glutamina morto no oitavo dia de pós-operatório
GLY	- Grupo Glicina
GLY 3	- Subgrupo Glicina morto no terceiro dia de pós-operatório
GLY 8	- Subgrupo Glicina morto no oitavo dia de pós-operatório
HE	- Hematoxilina-Eosina
hGH	- Hormônio de Crescimento
IAM	- Ingesta alimentar média
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia
Kcal	- Kilocalorias
Kg	- Kilograma
Kgf	- Kilograma-força

KW	- Teste de Kruskal-Wallis
LACTEC	- Laboratório Central do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento
M	- Média
MAC	- Mínima Concentração Anestésica
mg	- Miligrama
mm	- Milímetro
mM	- Milimolar
µm	- Micrômetro
Mol/l	- Moles por litro
N	- Tamanho da amostra
NPT	- Nutrição Parenteral Total
p	- Nível de significância estatística
P	- Pressão
PO	- Pós-operatório
RFA	- Ruptura fora da linha da anastomose
RTMI	- Resistência Mínima à Tração
t	- Teste t de Student
T	- Tensão
UK	- Reino Unido
vs.	- versus
° C	- Graus Celsius
=	- Igual a
±	- Mais ou menos
®	- Marca registrada
<	- Menor que
%	- Porcentagem

RESUMO

GLUTAMINA ORAL NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES COLÔNICAS EM RATOS

Introdução: Evidências recentes sugerem que a Glutamina é uma das fontes energéticas primárias do cólon. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação oral de Glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

Material e Método: Foram utilizados 48 ratos *Wistar* machos, adultos, com peso médio de $174,41 \pm 37,39$ g e alocados em gaiolas individuais. Todos os animais receberam água *ad libitum* e ração para ratos. Os ratos foram randomizados para receber solução isonitrogenada e isovolumétrica na dose de 1,5g/kg/dia de L-Glutamina a 10% (grupo GLN) ou de Glicina a 10% (grupo GLY) via sonda orogástrica durante 7 dias antes da operação e por mais 2 ou 7 dias de pós-operatório (PO), conforme o subgrupo pertencente. No oitavo dia, os animais foram anestesiados e duas secções colônicas foram realizadas, sendo uma 6 cm do *ostium ileale* (válvula íleocecal) e outra 5 cm distais à primeira. Foram confeccionadas anastomoses término-terminais em plano único, evertido, utilizando 8 pontos separados de nylon 6.0. Em seguida, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e tiveram livre acesso à água e ração. No terceiro, bem como no oitavo dia de PO metade dos animais de cada grupo foi morta e as duas anastomoses de cada animal foram conservadas, alternadamente, em solução salina a 0,9% e formalina à 10% para estudos de resistência à tração e histológico (HE e Densitometria do Colágeno), respectivamente. Foram avaliados também os parâmetros clínicos: variação de peso, ingesta alimentar média, índice de aderências intra-abdominais e número de óbitos. A análise estatística incluiu os testes t de Student e Kruskal Wallis.

Resultados: Não houve diferença significativa nos parâmetros clínicos entre os animais dos grupos GLY e GLN. Não houve diferença com relação à Força Máxima de Tração quando analisados tanto os grupos (GLY *vs.* GLN) quanto os subgrupos (GLY 3 *vs.* GLN 3 e GLY 8 *vs.* GLN 8). A Força de Ruptura Completa foi significativamente maior no grupo GLN (GLN: $0,068 \pm 0,045$ kgf *vs.* GLY: $0,042 \pm 0,027$ kgf, $p=0,04$). A média do infiltrado monomorfonuclear foi significativamente menor no grupo GLN em relação ao grupo GLY ($p=0,04$). A Densitometria do Colágeno demonstrou área percentual maior ocupada pelo Colágeno tipo I (maduro) no grupo GLN: $58,65 \pm 11,70\%$ *vs.* GLY: $41,79 \pm 10,54\%$ ($p=0,0000$), bem como nos subgrupos GLN 3: $54,22 \pm 10,02\%$ *vs.* GLY 3: $41,92 \pm 13,31\%$ ($p=0,04$) e GLN 8: $62,63 \pm 12,13\%$ *vs.* GLY 8: $41,67 \pm 7,69\%$ ($p=0,0004$). O Colágeno tipo III (imaturo) ocupou menor área percentual nas anastomoses dos animais pertencentes ao grupo GLN e subgrupos GLN 3 e GLN 8 ($p=0,0000$; $p=0,04$ e $p=0,0003$, respectivamente).

Conclusões: Conclui-se que a suplementação oral de Glutamina durante o período peri-operatório aumenta a Força necessária à Ruptura Total das anastomoses e a área percentual ocupada pelo Colágeno tipo I (maduro) nas anastomoses no 3º e 8º dias de PO.

Descritores: 1 - Glutamina; 2 - Anastomose cirúrgica – cólon – cicatrização de feridas.

ABSTRACT

ORAL GLUTAMINE ON THE HEALING OF COLONIC ANASTOMOSES IN RATS

Background: Recent evidences have suggested that Glutamine is one of the primary energy sources of the colon. The aim of this study was to evaluate the effects of oral Glutamine supplementation on the healing of colonic anastomoses in rats. **Methods and Materials:** Forty-eight adult male *Wistar* rats, weighing $174,41 \pm 37,39\text{g}$ were housed in individual cages. All rats had free access to water and standard rat chow. The rats were randomized to receive daily, during 7 days before the operation and during the post-op period, 10% L-Glutamine (GLN group) or 10% Glycine (GLY group) in isonitrogenous and isovolumetric solutions, at 1.5g/kg/day , through an orogastric tube. On the 8th day rats were anesthetized and subjected to 2 colonic transections, one 6 cm distal from the *ostium ileale* (ileocecal valve) and another 5 cm distal from the first. Bowel continuity was restored by two end-to-end, single layer, everted, anastomoses with 8 interrupted sutures (6/0 nylon). After the operation, rats were kept in individual cages and had free access to water and rat chow. One half of the rats of each group were then killed either on the post-op day 3 or post-op day 8 and the two colonic anastomoses of each animal were resected and stored in 0.9% saline and 10% formalin for tensile strength and histologic (HE and Collagen Densitometry) studies, respectively. Clinical parameters were also recorded: weight changes, mean food intake, intrabdominal adhesences and deaths. Student's *t* and Kruskal Wallis tests were used for statistical analysis. **Results:** Clinical parameters were similar in both groups. There was no difference in Maximum Tensile Strenght between groups (GLY vs. GLN) and subgroups (GLY 3 vs. GLN 3 e GLY 8 vs. GLN 8). Total Rupture Strenght was significantly higher in the GLN group (GLN: $0.068 \pm 0.045\text{ kgf}$ vs. GLY: $0.042 \pm 0.027\text{ kgf}$, $p=0.04$). The mean monomorfonuclear infiltrate was significantly smaller in GLN group ($p=0.04$). The Collagen Densitometry analysis demonstrated Type I (mature) collagen percentual area greater in the group GLN: $58.65 \pm 11.70\%$ vs. GLY: $41.79 \pm 10.54\%$ ($p=0.0000$), as well as in the subgroups GLN 3: $54.22 \pm 10.02\%$ vs. GLY 3: $41.92 \pm 13.31\%$ ($p=0.04$) and GLN 8: $62.63 \pm 12.13\%$ vs. GLY 8: $41.67 \pm 7.69\%$ ($p=0.0004$). Type III collagen (immature) percentual area was significantly smaller in group GLN colonic anastomoses (GLN: $p=0.0000$; GLN 3: $p=0.04$ and GLN 8: $p=0.0003$, respectively). **Conclusions:** Oral peri-operative Glutamine supplementation increases Total Rupture Strenght and improves the percentual area of Type I (mature) colagen at the anastomoses sites on post-op days 3 and 8.

Key Words: 1 - Glutamine; 2 - Surgical anastomosis – colon - wound healing.

1 INTRODUÇÃO

As anastomoses intestinais constituem, mesmo após anos de investigação, assunto polêmico e repleto de controvérsias. A perfeita cicatrização de anastomoses colônicas tem importância capital na prática clínica, haja vista que o comprometimento deste processo pode resultar em deiscência, fístula e peritonite fecal. HENDRIKS & MASTBOOM (1990), em extensa revisão da literatura, encontraram variabilidade de 0 a 35% na incidência destas complicações, influenciada pelas diferentes populações estudadas e pela presença de fatores de risco nos pacientes. A ocorrência de deiscência anastomótica leva, de maneira geral, ao aumento de duas vezes na duração do internamento, de três vezes no índice de mortalidade perioperatória e, conseqüentemente, à elevação considerável dos custos do tratamento (KORUDA & ROLANDELLI, 1990; CAMPOS, MEGUID e COELHO, 1996).

Muitos fatores têm sido identificados como influenciadores do processo cicatricial das anastomoses colônicas, tais como: preparo intestinal, técnica cirúrgica e estado nutricional do paciente. Exatamente por ser este processo multifatorial, torna-se extremamente difícil investigar os mecanismos de ocorrência e, conseqüentemente, de prevenção da deiscência colônica no contexto clínico. Assim sendo, diversos estudos têm procurado desenvolver modelos animais, visando ao estudo da cicatrização colônica e da patogênese da falência do processo cicatricial (BLONMQUIST, JIBORN e ZEDERFELDT 1984; BRASKEN 1991; GARCIA-OLMO & PAYA 1996).

Durante as décadas de 50 e 60 as pesquisas foram direcionadas ao estudo dos fatores de ordem técnica capazes de interferir na cicatrização. Estas pesquisas contribuíram com alguns conceitos, hoje universalmente aceitos, como a importância da inversão ou eversão das paredes intestinais na linha de sutura para melhorar a coaptação dos bordos e a necessidade de inclusão da submucosa nos pontos, por ser esta camada rica em colágeno (GETZEN & HOLLOWAY 1966; CRONIN, JACKSON e DUNPHY 1968).

Mais recentemente houve crescente interesse para o estudo dos efeitos dos agentes farmacológicos sobre a cicatrização, tanto benéficos quanto deletérios. Dentre estas substâncias podem ser citados os anti-inflamatórios hormonais e não-hormonais, vários tipos de antibióticos, prostaglandinas, antineoplásicos, imunomoduladores e dietas específicas (ROLANDELLI, KORUDA, SETTLE e ROMBEAU, 1986; CAMPOS, MUCERINO, WAITZBERG, LOGULO, El IBRAHIM, NADALIN e HABR-GAMA, 1994; SKINOVSKY, 2000; VIZZOTTO, 2001). Mediante suporte nutricional organoespecífico, dietas especiais contêm nutrientes que teriam a capacidade de preservar, de forma estrutural e metabólica, o enterócito e o colonócito, procurando com isso estimular o processo cicatricial.

A Glutamina é o aminoácido mais abundante no organismo e, ao mesmo tempo, o mais afetado pelo catabolismo. A depleção de Glutamina é característica de doenças graves e de estados de hipercatabolismo como, por exemplo, pós-operatórios resultando em diminuição rápida de sua concentração a nível de músculo esquelético e de intestino delgado. O intestino, em sua totalidade, é o responsável direto por cerca de um terço da Glutamina circulante, sendo um órgão dependente deste aminoácido, considerado seu principal combustível (SCHEPPACH, LOGES, BARTRAM, CHRISTL e RICHTER 1994).

Considerando a importância metabólica da Glutamina, em particular no intestino, alguns autores avaliaram o efeito da suplementação deste aminoácido na cicatrização de anastomoses intestinais. McCAULEY, PLATELL e McCULLOCH, 1991 administraram solução de Nutrição Parenteral Total enriquecida com Glutamina a 1,2%, solução parenteral padrão e ração específica para ratos por 6 dias após confecção de anastomose colônica em ratos desnutridos. Falharam em demonstrar diferenças na cicatrização testada por pressão de ruptura, mas o teor de proteína contido na submucosa aumentou significativamente.

A Glutamina, sob forma de enema, aumenta os valores de pressão de ruptura e da concentração de hidroxiprolina tecidual comparada a controles sem tratamento quando administrada no momento da confecção de anastomose colônica em ratos com

oclusão de cólon descendente previamente realizada (ERBIL, ÇALIS, BERBER e MERCAN, 1999).

No entanto, poucos investigadores estudaram a administração de Glutamina isolada na cicatrização de anastomoses colônicas.

1.1 OBJETIVO

1. Objetivo geral

Avaliar a influência da suplementação oral da Glutamina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos Wistar no 3º e 8º dias de pós-operatório, usando Glicina como controle isonitrogenado.

2. Objetivos específicos

- a) Efeito da GLN nos parâmetros clínicos da evolução pós-operatória;
- b) Efeito da GLN na força de tração das anastomoses;
- c) Efeito da GLN no padrão histológico (HE e Densitometria de Colágeno) das anastomoses;
- d) Comparar força de tração e padrão histológico entre 3º e 8º dias de PO.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS CIRÚRGICAS

A cicatrização é o processo de reparação comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou. CARREL, em 1910, fez a primeira descrição ordenada dos eventos da cicatrização, que são aceitos até hoje. Em 1929, HOWES, SOOY e HARVEY definiram a cicatrização como fenômeno que se desenvolve em três etapas: fase inflamatória, fase de fibroplasia e fase de maturação.

Hoje em dia, é aceito que a cicatrização obedece à uma série de cinco eventos, que se inicia com a fase inflamatória seguida pela fase de proliferação celular, formação de tecido conjuntivo, contração da ferida e remodelação da ferida (ORGILL & DEMLING 1988).

A fase inflamatória é caracterizada inicialmente por vasoconstricção local decorrente de mediadores vasoativos, como tromboxane A₂, liberados pelas plaquetas aderidas ao local onde houve a lesão endotelial. Na sequência, pela ação das prostaglandinas, é deflagrada vasodilatação tecidual local. Com a vasodilatação começa a haver saída de fluidos e macromoléculas para o interstício. O passo seguinte é a adesão de neutrófilos atraídos quimiotaticamente pelos mediadores da inflamação. Inicia-se aí o processo de remoção dos tecidos desvitalizados e dos microorganismos presentes na ferida. As substâncias liberadas pelos neutrófilos começam a atrair os macrófagos e monócitos, que serão as células dominantes nos primeiros dias do processo inflamatório, complementando a remoção dos resíduos e orquestrando o início do processo de reparação (WAHL & WAHL 1992).

A fase de proliferação celular, em continuidade à fase anterior, inicia-se com o aparecimento dos primeiros fibroblastos atraídos pelos fatores liberados pelos macrófagos. Esta fase é marcada pela proliferação fibroblástica, pela angiogênese e pela epitelização; todos estes processos são decorrentes da multiplicação celular e

sofrem influência de fatores angiogênicos e de crescimento pelas células inflamatórias (BANDA, KNIGHTON, HUNT e WEBER 1982).

A terceira fase, onde ocorre a formação de tecido conjuntivo, é decorrente do início da produção de fibras de colágeno por parte dos fibroblastos. Os fibroblastos apresentam intenso processo proliferativo até por volta do oitavo dia. A partir daí, inicia-se o processo de produção de colágeno, com início da fase de maturação. Do ponto de vista clínico esta é a fase mais importante da cicatrização, pois é a taxa, qualidade e quantidade total de matriz depositada que vai determinar a resistência da cicatriz (JULIANO & HASKILL 1993).

As duas últimas fases, de contração e de remodelação, são processos mais tardios responsáveis pela maturação das feridas. A primeira, que se dá com participação intensa dos miofibroblastos e tem como consequência a redução do tamanho da lesão. A segunda, decorrente da formação de pontes entre as fibras de colágeno, tem como resultado a formação de cicatriz madura (RUDOLPH, VAN DER BERG e EHRLICH 1992).

A proteína colágena é a mais abundante do organismo dos mamíferos e representa 30% do total das proteínas do homem. É o principal componente do tecido conjuntivo. Apesar de ser uma molécula complexa, o colágeno apresenta composição bem característica, formada por 3 cadeias polipeptídicas configuradas em hélice e unidas por pontes de hidrogênio, denominadas cadeias alfa, sendo cada uma delas codificada por um gene, o que dá origem a diversos tipos dessa proteína; cada cadeia alfa é formada por cerca de 1000 aminoácidos (PROCKOP, KIVIRIKKO, TUDERMAN e GUZMAN 1979).

Das quase duas dezenas de tipos de colágeno já descritos, o chamado colágeno tipo I (sintetizado pelos fibroblastos), é o mais freqüente, perfazendo 90% da proteína colágena do corpo dos mamíferos; o colágeno tipo III também é sintetizado pelos fibroblastos. Esse último é depositado cedo no tecido em cicatrização e caracteriza o colágeno imaturo; mais tarde, com a remodelação surge o tipo I, de características maduras (CRONIN, JACKSON e DUNPHY 1968; WITTE e BARBUL, 1997).

HERMANN, WOODWARD e PULASKI, 1964, observaram, em ratos, que a seqüência de eventos que ocorre na cicatrização das anastomoses digestivas é semelhante à que ocorre nos demais tecidos, sendo que a fase inflamatória estendeu-se até o quarto dia, a fase de fibroplasia até o décimo quarto e, a partir daí, a fase de maturação.

JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT em 1980, mediante utilização de hidroxiprolina radiomarcada, avaliaram o padrão de reparação das anastomoses colônicas em ratos. Observaram que há intenso ciclo de síntese e degradação das fibras colágenas no início do processo de cicatrização da anastomose, com predomínio da degradação até o quarto dia de pós-operatório. Por volta do sétimo dia de pós-operatório o processo de síntese sobrepuja o de degradação. Observaram também que este processo cíclico de síntese e degradação do colágeno ocorre não só na área da anastomose, mas também nos segmentos peri-anastomóticos, principalmente no segmento proximal.

2.2 O AMINOÁCIDO GLUTAMINA

A Glutamina teve sua primeira importante consideração biológica há cerca de 100 anos, quando foi sugerido, com base em evidências indiretas, que ela agiria como componente estrutural das proteínas. O conceito de que a Glutamina pode apresentar propriedades metabólicas importantes veio de estudos realizados nos anos 50, nos quais demonstrou-se que este aminoácido era um nutriente essencial para células em cultura, inicialmente para fibroblastos e, posteriormente, para todas células de mamíferos, atuando em seu crescimento e sobrevivência. É um aminoácido considerado não essencial, de peso molecular de 147,1 D, contém 5 carbonos com dois radicais amino e representa cerca de 30-35% do nitrogênio que é transportado no plasma. A Glutamina é o aminoácido mais abundante no sangue total, com concentrações de $\pm 600-650$ mol/l, perfazendo cerca de 50% de todo o “pool” de aminoácidos livres no organismo. Após traumas, cirurgias e sepse há diminuição considerável de seus níveis tanto intracelular (50%), quanto plasmático (20-30%). Este

aminoácido é consumido avidamente por células de alto “*turnover*” como fibroblastos, linfócitos, células tumorais e componentes epiteliais intestinais, principalmente de intestino delgado e grosso (SOUBA, SMITH e WILMORE 1985; SOUBA, HERSKOWITZ, AUSTGEN, CHEN e SALLOUM 1990 e SOUBA, KLIMBERG, PLUMLEY, SALLOUM, FLYNN, BLAND e COPELAND 1990).

SMITH (1990) relatou, após observações com relação a dosagens diferentes deste aminoácido em meios de cultura, que a máxima proliferação celular ocorre quando a concentração de Glutamina é mantida em torno de 0.5 mM ou acima; concentração que se aproxima dos seus níveis plasmáticos em situações normais, sem estresse metabólico.

Em 1998, McCAULEY, KONG e HALL afirmaram mediante estudos com experimentação animal, que 57% do carbono proveniente da Glutamina é oxidado a CO₂ e que 32% da totalidade de CO₂ liberado pelo intestino é derivado da Glutamina. Sendo assim, a Glutamina é metabolizada extensivamente no intestino e os elementos carbono e nitrogênio estão sempre disponíveis para síntese de outros aminoácidos, lactato e nucleotídeos. Após sua distribuição pelos tecidos, funciona como pré-requisito para biossíntese de ácidos nucleicos em todas as células do organismo.

A falta de Glutamina leva à atrofia da mucosa intestinal. A mucosa do intestino delgado se mantém mediante balanço entre proliferação e morte celular provocada por apoptose. PAPAConstantinou, HWANG, RAJARAMAN, HELMICH, TOWNSEND e KO em 1998, realizaram estudo para determinar se a privação celular de Glutamina pode induzir apoptose em células do epitélio intestinal de ratos e para comparar este efeito com a privação de Metionina/Cisteína. Chegaram à conclusão que as deficiências de Glutamina e de Metionina/Cisteína são responsáveis pela diminuição das células intestinais. A deficiência de Glutamina, isoladamente, funciona como facilitadora de apoptose celular. Estes resultados sugerem que a Glutamina serve como fator específico de sobrevivência celular nos enterócitos.

TORRES (2002) estudou os efeitos da infusão de L-alanil Glutamina sobre a concentração de substratos metabólicos musculares e circulantes após isquemia aguda da pata traseira esquerda em ratos. O autor concluiu que a infusão do aminoácido

diminui as concentrações de lactato e de corpos cetônicos no músculo isquêmico além de aumentar a lactacemia 5 minutos após a reperfusão.

2.2.1 A Suplementação de Glutamina em Estudos Experimentais

Com relação à suplementação de Glutamina em dietas enterais, em solução parenteral e enemas há certa variabilidade na literatura com relação à dose preconizada, tempo de utilização, bem como aos métodos de administração para animais de experimentação. GISMONDO, DRAGO, FASSINA, VAGHI, ABBIATI e GROSSI em 1998, utilizaram solução de Glutamina a 4% diluída em água livre em um grupo de 24 ratos atímicos associada à ração específica para espécie. Este grupo foi comparado a outro, também atímico, com a mesma dieta, porém sem a adição de glutamina após 10 dias de evolução com relação ao efeito imunoestimulante das dietas. Houve aumento considerável nos níveis circulantes de interleucina-2 e aumento discreto, mas significativo, na contagem de células T intestinais. Os autores concluíram que a Glutamina oral exerce imunoestimulação local e sistêmica e pode ser de relevância na prevenção da perda da integridade intestinal e da defesa imunológica associada com situações como: trauma, cirurgia e desnutrição.

FOITZIK, KRUSCHEVSKI, KROESEN, HOTZ, EIBL E BUHR (1999) utilizaram modelo experimental de ratos submetidos a colite ou pancreatite grave para testar o efeito da suplementação de Glutamina (0.5g/kg/dia), adicionada à solução padrão parenteral durante 4 dias após a injúria, na microcirculação colônica e na permeabilidade intestinal. A glutamina diminuiu significativamente a permeabilidade intestinal nos animais com pancreatite. Houve diminuição nos índices de infecção e de mortalidade no grupo de animais tratados com o aminoácido quando comparado ao grupo controle com nutrição parenteral padrão. Nos animais submetidos a colite, a suplementação de Glutamina não exerceu efeitos nestes parâmetros, apenas aumentando o fluxo sanguíneo capilar em áreas do cólon não adjacentes ao local de maior injúria.

ERSIN, TUNCYUREK, ESASSOLAK, ALKANAT, BUKE, YILMAZ, TELEFONCU e KOSE (2000), administraram 15g/dia de ração para ratos Sprague-Dawley com e sem suplementação de Glutamina antes (7 d) e após (7d) ou apenas após a indução de enterite por radiação para estudar níveis de translocação bacteriana e morfologia intestinal. Os índices de translocação foram significativamente maiores no grupo controle (sem dieta enriquecida). Tanto o número de vilos quanto os valores de espessura da mucosa foram maiores nos grupos com dieta suplementada com o aminoácido. Os autores concluem que a dieta enriquecida possui efeito protetor na mucosa após a irradiação intestinal.

Com o objetivo de avaliar a cicatrização de anastomoses colônicas realizadas em ratos Wistar com oclusão de cólon esquerdo, ERBIL, ÇALIS, BERBER e MERCAN (2000) testaram os efeitos de enemas per-operatórios de povidona-iodo, salina, aminoácidos de cadeia curta, glutamina e N-nitro L-arginina Metil-ester (L-NAME) comparados a um grupo controle, sem tratamento. As coletas de dados foram realizadas nos dias 3 e 6 de pós-operatório e foram avaliados a pressão de ruptura e a concentração de hidroxiprolina. Nos animais submetidos ao tratamento com salina, povidona-iodo e ácidos graxos de cadeia curta as pressões de ruptura foram significativamente maiores ($p<0,05$, $p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente) e os valores de hidroxiprolina foram semelhantes aos controles. Tanto a pressão de ruptura quanto a dosagem de hidroxiprolina foram maiores no grupo glutamina ($p<0,001$). No grupo L-NAME os valores de pressão foram menores e a dosagem de hidroxiprolina semelhante. Os autores concluem que a nutrição e perfusão tecidual são essenciais para a cicatrização colônica e que a Glutamina, na forma de enema, melhora significativamente este processo.

SALVALAGGIO (2000) utilizou, em modelo experimental de oclusão intestinal para avaliar a translocação bacteriana, L-Glutamina ou Glicina (controle isonitrogenado) a 5% na dose de 1,5g/kg/dia, administradas diariamente via sonda orogástrica. A duração da administração dos aminoácidos foi de 8 dias: sete pré-oclusão de íleo terminal e no dia da realização da intervenção cirúrgica, com inoculação de suspensão de *Escherechia coli* ATCC 25992 proximal ao nível de

oclusão. A translocação bacteriana foi idêntica em ambos os grupos. Entretanto o uso de Glutamina durante o período prévio à lesão diminuiu o número de hemoculturas positivas e das culturas dos baços, fígados e pulmões. O autor conclui que a Glutamina apresenta efeito protetor sobre a barreira intestinal não órgão-específica.

2.2.2 Efeitos da Glutamina Sobre a Cicatrização Intestinal e de Anastomoses Colônicas

Em 1991 McCAULEY, PLATELL, HALL e McCULLOCH utilizaram modelo animal com ratos Wistar desnutridos para avaliação de anastomoses colônicas com e sem suplementação de Glutamina por via parenteral. Após serem alimentados durante 6 dias com ágar a 3,5% e perderem, em média, 10% do peso corpóreo, os animais foram submetidos à inserção de catéter jugular para nutrição parenteral e à secção seguida de anastomose término-terminal, em plano único, com pontos separados de nylon 9.0 de cólon ascendente. Foram então distribuídos em três grupos com dietas variadas: ração para ratos, nutrição parenteral com Glutamina e nutrição parenteral com Glicina. Após 6 dias de pós-operatório os ratos foram mortos e colheram-se amostras de sangue da veia cava inferior para dosagens plasmáticas de nitrogênio. O segmento de 3 cm do cólon proximal contendo a anastomose em sua porção central foi submetido ao teste de resistência à pressão de ruptura, e o restante do cólon teve sua mucosa retirada, pesada e avaliada quanto ao seu conteúdo protéico. O conteúdo de nitrogênio dosado no plasma não foi diferente entre os grupos estudados. Entretanto, o peso da mucosa colônica foi significativamente maior nos animais alimentados com ração, e foi intermediário nos ratos com suplementação de Glutamina. Este último grupo apresentou a maior concentração protéica em sua mucosa ($p < 0,05$). Com relação ao teste de resistência à pressão de ruptura, todas as amostras foram rompidas fora da linha de anastomose sem diferença significativa dos valores pressóricos entre os grupos. Apesar de estudos prévios de utilização de NPT enriquecida com Glutamina terem demonstrado aumento do peso jejunal e colônico, do DNA e da proteína da mucosa, bem como do peso da mucosa intestinal, a administração de NPT enriquecida

com Glutamina a 1,2% falhou em melhorar a cicatrização de anastomoses colônicas realizadas em ratos desnutridos.

A importância dos nucleotídeos na recuperação do intestino lesado, seja por privação alimentar, irradiação ou cirurgia é evidente. Além da função de fonte energética para os enterócitos, a Glutamina também teria o papel de fornecedora de nitrogênio para a síntese destes componentes imprescindíveis a todos os tecidos com alta renovação celular, incluindo as células envolvidas na cicatrização anastomótica: colonócitos e fibroblastos. Além disso, um dos produtos finais do metabolismo da Glutamina é a Prolina, substância que é necessária à produção de todos os tipos de colágeno envolvidos nas etapas da cicatrização e como constituintes dos tecidos (McCAULEY et al., 1998).

Testando a hipótese de que a Arginina e a Glutamina administradas profilaticamente na dieta de ratos submetidos a dose única de irradiação abdominal com 1100 cGy podem proteger o intestino, ERSIN et al. (2000) observaram, mediante culturas de linfonodos mesentéricos e estudo microscópico de íleo, jejuno e cólon, aumento significativo do índice de translocação bacteriana ($p < 0,05$) e diminuição do número e altura das vilosidades intestinais nos animais sem tratamento ($p < 0,001$). Evidenciam a importância da suplementação de glutamina em estados hipercatabólicos prolongados. Sendo a Glutamina considerado o principal combustível da mucosa intestinal, este aminoácido toma o papel de componente dietético essencial, especialmente na manutenção do crescimento e função deste órgão.

CAMPOS et al (1994) realizaram experimento para avaliar histologicamente o efeito protetor de dietas poliméricas e elementares enriquecidas com glutamina na prevenção da enterite actínica. Sessenta e cinco ratos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos e alimentados com dietas isocalóricas e isonitrogenadas: 1- dieta polimérica com caseína, 2- dieta polimérica com caseína enriquecida com glutamina a 2% e 3- dieta elementar com glutamina a 2% durante 7 dias. Após o período de adaptação alimentar os animais foram submetidos à cinco doses de 300 cGy e, no quinto dia após a irradiação foram operados e tiveram seu intestino delgado e cólon ressecados para estudo histológico. Os animais dos grupos 2 e 3 apresentaram maior

celularidade, número de mitoses e médias superiores de altura das vilosidades no intestino delgado em comparação aos controles. No cólon, as médias de altura das criptas dos grupos 2 e 3 foram iguais e superiores ao controle, sem porém ser evidenciada diferença com relação à celularidade e ao número de mitoses. Os autores concluíram que a suplementação alimentar de Glutamina antes, durante e após irradiação abdominal em ratos determinou efeitos protetores sobre o intestino delgado e grosso irradiados, preservando sua arquitetura morfológica e a sua capacidade de regeneração.

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES INTESTINAIS

As anastomoses intestinais podem ser avaliadas mediante parâmetros clínicos, mecânicos, histopatológicos e bioquímicos. Outros métodos, menos comumente utilizados, são os parâmetros microbiológicos, radiográficos, microangiográficos e de microscopia eletrônica.

2.3.1 Parâmetros Clínicos

Os parâmetros clínicos levam em conta a evolução pós-operatória do animal e os achados intra-abdominais após sua morte, seja ela em meio à fase de experimentação ou provocada no término desta para coleta de dados. Eles indicam o sucesso ou insucesso da anastomose e refletem a presença de deiscência anastomótica o que, em última análise, se procura avaliar nos experimentos em que se estuda cicatrização de anastomoses colônicas.

Os dados evolutivos mais comumente explorados são: ganho ou perda de peso e a evolução pós-operatória (óbitos). À exploração da cavidade abdominal, os dados mais freqüentemente avaliados são: quantificação e qualificação de aderências pós-operatórias e possíveis complicações anastomóticas (deiscência, abscesso peri-anastomótico e estenose), entre outros.

2.3.1.1 Peso

A perda de peso pode interferir na evolução das anastomoses intestinais. Decréscimo ponderal durante o período peri-operatório sugere certo grau de desnutrição, o que pode acarretar deficiência na cicatrização e, conseqüentemente, maior incidência de complicações anastomóticas.

LAW & ELLIS (1990) avaliaram o efeito da nutrição parenteral sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos com desnutrição protéica. Foram comparados três grupos de animais: dieta normal (1), dieta hipoprotéica (2) e dieta hipoprotéica com nutrição parenteral (3). O delineamento do experimento consistiu de submeter os animais à laparotomia com realização de anastomoses colônicas, sendo testada a resistência da parede abdominal à tração e da anastomose através da medida da pressão de ruptura. Comparando-se os dois primeiros grupos observou-se que a pressão de ruptura foi significativamente menor no grupo 2 ($p < 0,001$). Aliado a este achado, observou-se também que esta diminuição da força de ruptura nos animais com dieta hipoprotéica pode ser parcialmente revertida com a utilização da nutrição parenteral, haja vista que os valores de pressão de ruptura no grupo 3 foram significativamente maiores que os do grupo 2, porém menores que do primeiro grupo. Os autores demonstram a importância da nutrição na cicatrização e de que maneira a última pode ser afetada pela primeira.

KARAHASANOGLU, ALTINLI, HAMZAOGLU, PAKSOY, YESILDERE e ALEMDAROGLU (1998) realizaram estudo experimental de avaliação da cicatrização de anastomoses colônicas no qual 40 ratos Sprague-Dawley foram divididos em quatro grupos: os grupos 1 e 2 receberam dieta normal (3-6g de proteína, 40Kcal/dia) e os grupos 3 e 4 receberam dieta isocalórica, mas hipoprotéica (1-2g de proteína) por 10 dias antes da cirurgia. Após a realização de anastomose colônica, os animais tiveram acesso livre à ração normal para ratos. Durante quatro dias os ratos dos grupos 1 e 3 receberam 2mg/kg de Hormônio de crescimento (hGH) por via subcutânea, enquanto os grupos 2 e 4 receberam salina. No dia 4 de pós-operatório os animais foram mortos

e foram realizados: teste da pressão de ruptura da anastomose e dosagem de hidroxiprolina tecidual por espectrofotometria. Houve redução de 15% no peso dos ratos alimentados com dieta hipoprotéica até a cirurgia que continuou após o procedimento em torno de 5% ($p < 0,05$). A pressão de ruptura foi menor nos ratos desnutridos em relação aos animais alimentados com dieta normoprotéica com significância estatística. Não houve diferença na dosagem de hidroxiprolina entre os grupos. Os autores concluíram que, de maneira indireta, o peso serve como parâmetro clínico na avaliação da cicatrização de anastomoses intestinais.

2.3.1.2 Incidência de Óbitos

LEITE, NARESSE, KOBAYASI, MINOSSI, BURINI, CURI e HOSSNE (1993) estudaram o efeito da desnutrição protéica na anastomose de cólon distal em amostra de 185 ratos Wistar mediante força de ruptura, colágeno tecidual e parâmetros clínicos. Observaram 4 casos de deiscências anastomóticas acompanhadas de óbito no grupo de animais desnutridos, enquanto esta complicação não ocorreu no grupo controle que recebeu dieta normoprotéica para a espécie, demonstrando assim a relação direta que existe entre deiscência completa, peritonite fecal e óbito.

NARESSE, LEITE, RODRIGUES, ANGELELI, MINOSSI e KOBAYASI (1993), estudaram os efeitos da peritonite fecal induzida em ratos Wistar sobre a cicatrização de anastomoses realizadas no cólon distal. Encontraram no grupo submetido à confecção de anastomose na vigência de peritonite, incidência de deiscência em 10 animais (8%) dos quais 7 evoluíram a óbito. Os achados corroboram em demonstrar o efeito deletério da presença de infecção instalada intra-abdominal concomitante à realização de suturas no intestino grosso.

2.3.1.3 Aderências Intra-Abdominais

A formação de aderências intra-abdominais reflete a capacidade de resposta inflamatória reparadora de agressão à cavidade peritoneal e, de certa forma, a atividade

do processo de reparação cicatricial. O aspecto principal no índice de aderências, no entanto, está no fato de que quando há deiscência da anastomose e extravazamento do conteúdo intestinal há concomitante tendência de bloqueio do organismo mediante formação de aderências por parte do mesentério e de vísceras adjacentes ao processo inflamatório. Assim, quanto maior a incidência de deiscência anastomótica, maior será o índice de aderência esperado.

Um método de sistematização para a avaliação de aderências intraabdominais foi proposto por KNIGHTLY, AGOSTINO e CLIFFTON (1962). Os autores investigaram o efeito da fibrinolisa e da heparina na formação de aderências peritoneais, tendo atribuído índices para caracterizar cada nível de intensidade do processo aderencial e possibilitando assim sua aferição e a comparação entre os diversos grupos. Outro sistema de quantificação destas aderências é o descrito e utilizado por VAN DER HAMM, KORT, WEIJMA, VAN DEN INHG e JEECKEL (1992). Neste experimento os autores avaliaram o efeito de antibióticos na ação selante da fibrina na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.

KUZU, KOSKOY, KALE, DEMIPRENÇE e RENDA (1998) utilizaram o índice proposto por KNIGHTLY em 1962 e avaliaram a interferência do 5-fluorouracil administrado intraperitonealmente no pré-operatório de anastomoses colônicas na formação de aderências intra-abdominais. Os autores não encontraram diferença significativa na média dos índices de aderência entre os grupos experimental e de controle com salina intraperitoneal.

2.3.2 Métodos Mecânicos

HOWES, SOOY e HARVEY (1929) realizaram estudo pioneiro visando à sistematização da avaliação da tensão das feridas cirúrgicas na fase precoce da cicatrização. Neste experimento foram avaliadas a resistência da sutura em anastomoses intestinais e a habilidade da parede intestinal em conter a sutura realizada por meio de diferentes técnicas. Houve correlação entre as forças de tensão necessárias à ruptura dos tecidos estudados e o processo fibroplásico conhecido.

A avaliação da resistência das anastomoses intestinais por métodos mecânicos tem sido realizada mais frequentemente por duas técnicas: pressão de ruptura, e força de ruptura.

2.3.2.1 Pressão de Ruptura

Este método foi descrito há pouco mais de um século por CHLUMSKY, em 1899 e é bastante utilizado atualmente em estudos experimentais de cicatrização [como no de RABAU, EYAL, KLUGER e DAYAN em 1998]. A avaliação é feita no segmento do intestino onde foi realizada a anastomose, sendo que esta fica exatamente no centro da peça a ser testada. Uma das extremidades é fechada e na outra se conecta uma bomba de insuflação. Através desta última infunde-se líquido ou ar atmosférico até que haja ruptura da anastomose. A pressão de ruptura é registrada por manômetro ou fisiógrafo. Este método pode ser aplicado ao animal vivo e anestesiado, sem se desfazer as aderências perianastomóticas ou em segmento ressecado; os resultados serão diferentes nos dois casos, mas ambos com validade científica.

Outro método útil e simples utilizado para avaliação da pressão de ruptura foi descrito por CARRIL em 1970 e largamente utilizado por diversos autores como ROCHA em 1989, SOUSA, SOARES e APRILLI em 1991 e MARTINS, GUIMARÃES e FERREIRA em 1993. Este método consta de um sistema em que, através do lúmen da alça intestinal, passa-se um cilindro metálico oco, com orifícios e fechado com uma rolha em uma de suas extremidades. Com um fio de cordonê se fixa uma das extremidades da alça intestinal na rolha. Na outra extremidade do cilindro oco introduz-se outra rolha que envolve o cilindro sem permitir qualquer vazamento. Na extremidade livre do cilindro conecta-se um manguito que está ligado a um manômetro de mercúrio. O segmento de intestino é então colocado em uma cuba contendo líquido. Insufla-se ar pelo manguito que provoca a distensão do segmento intestinal e também provoca gradativamente a subida do nível de mercúrio no manômetro. A pressão atingida no manômetro quando começa o vazamento de ar pela anastomose é considerada a pressão de ruptura.

2.3.2.2 Força Tênsil de Ruptura

A força de ruptura é medida pela força de tração do segmento de tecido até que o mesmo se rompa. FARHART, AMER, WEEKS e MUSSELMAN (1958) desenvolveram um dispositivo mecânico para efetuar a tração de um segmento de tecido e o utilizou para avaliação de anastomoses em processo de cicatrização. Posteriormente houve aprimoramento do método com o desenvolvimento de um dispositivo eletro-mecânico, descrito por JONSSON, JIBORN e ZEDERFELDT (1983), com maior precisão para a aferição da força de ruptura. A utilização do método de força de tração para avaliação da resistência das anastomoses intestinais, como proposto por JONSSON em 1983, se dá pela fixação das extremidades do segmento de intestino no aparelho seguida de tração até que haja a ruptura deste segmento no local onde está a anastomose. A tração pode ser exercida com aumento contínuo da força, como utilizado por BLOMQUIST, JIBORN e ZEDERFELDT em 1984, ou aumentando-se a força em intervalos.

NARESSE, MENDES, CURI, LUCCHIARI e KOBAYASI (1987) idealizaram um aparelho de tração para avaliar a força de ruptura das anastomoses intestinais. Os autores idealizaram este aparelho com base no extensômetro de resistência elétrica (*Strain Gauge*). Para avaliar sua precisão foram utilizados 32 cães submetidos à anastomose de intestino delgado e aleatoriamente divididos em quatro grupos. De cada animal, em tempos diferentes de avaliação pós-operatória (3º, 7º, 14º e 21º PO), foram obtidas duas amostras: uma contendo a anastomose e outra de intestino delgado íntegro. Ambos os segmentos foram submetidos à tração no aparelho supracitado. Este foi ajustado e aferido com diferentes escalas de peso com o objetivo de testar sua precisão. As leituras de força de ruptura não apresentaram diferenças significativas frente à adição dos pesos padrões nas aferições de 100 a 600 gramas. Analisando-se a regressão linear dos resultados obtidos encontraram erro de leitura inferior a 2%. Houve variação significativa e progressiva da intensidade da força de ruptura nos segmentos contendo a anastomose nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório ($p < 0,01$,

$p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) quando comparada aos segmentos íntegros de intestino delgado. A força de ruptura testada no subgrupo morto no 21º dia não apresentou diferença estatística em relação ao intestino íntegro. Os autores concluíram que o instrumento utilizado para medida de força de ruptura apresenta erros mínimos de leitura, tornando justificável sua utilização em investigações experimentais, não só da cicatrização intestinal, como de toda ferida cirúrgica.

A força de ruptura pode ser utilizada para se avaliar apenas um tira de tecido contendo a anastomose no centro como NARESSE, LUCCHIARI e KOBAYASI (1988) e NARESSE, LUCCHIARI, ANGELELI, BURINI, RODRIGUES, CURI e KOBAYASI (1988), ou toda extensão da alça intestinal com a anastomose como descreveram LEITE, NARESSE, KOBAYASI, MINOSSI, BURINI, CURI e HOSSNE (1993) e NARESSE et al (1993).

Mais recentemente houve o desenvolvimento de um método mecânico computadorizado de alta precisão para a determinação da força de ruptura, descrito por IKEUCHI, ONODERA, AUNG, KAN, KAWAMOTO, IAMAMURA e MAETANI em 1999. Os autores tentaram estabelecer correlação entre este método e o método de pressão de ruptura, já consagrado na literatura, bem como definir qual deles seria considerado o padrão ouro na avaliação mecânica da cicatrização de anastomoses intestinais. Foram utilizados 48 ratos em modelo experimental que tinha como objetivos estimar a pressão e tensão de ruptura, simultaneamente, na mesma anastomose colônica efetuada em cada animal, no período compreendido entre a realização da cirurgia e o 14º dia de pós-operatório. A tensão de ruptura foi determinada mediante duas variáveis: força mínima de tração (força necessária para romper parte da anastomose) e força máxima de tração (força necessária para realizar a disjunção da anastomose). Durante a análise das variáveis os autores notaram que, durante a fase inflamatória da cicatrização (0-4 dias), havia pobre correlação entre força e pressão de ruptura, enquanto na fase fibroplásica (≥ 5 dias) esta correlação se mostrou altamente significativa mediante análise regressiva. Valores positivos de forças mínimas e máximas de tensão foram encontrados quando as pressões de ruptura correspondentes eram iguais a zero. Os autores concluíram que a força mínima de

tensão seria o melhor método para avaliação biológica da cicatrização das anastomoses enquanto que a pressão de ruptura seria mais adequada na pesquisa de integridade anastomótica em geral, não refletindo o processo cicatricial.

2.3.3 Métodos Histológicos

A microscopia ótica é um método de avaliação do processo de cicatrização de anastomoses intestinais muito utilizado em estudos clínicos e experimentais. Sua real importância é, de certo modo, questionada pela subjetividade na avaliação. Entretanto, quando realizada por patologistas experientes e imparciais, pode fornecer dados passíveis de quantificação que são fundamentais na análise e comparação de processos cicatriciais.

O processo de reparação pode ser avaliado mediante técnica de coloração com hematoxilina-eosina (HE), utilizando diversos indicadores tais como: exsudato neutrofílico, edema intersticial, necrose de mucosa, necrose transmural, deposição de fibrina, congestão vascular, infiltrado monomorfonuclear, atividade regenerativa da mucosa, proliferação fibroblástica, neoformação vascular, processo granulomatoso e fibrose intersticial.

VIZZOTTO (2001) fez uso dos parâmetros histológicos de edema, infiltrado polimorfonuclear e congestão como indicadores de processo inflamatório agudo. Os parâmetros de fibrose, presença de tecido de granulação e infiltrado monomorfonuclear eram sugestivos de processo inflamatório crônico. Utilizou este método para avaliar cicatrização de anastomoses colônicas de ratos na vigência de quimioterapia intraperitoneal.

STOOP, DIRKSEN e HENDRIKS em 1996, bem como BRASKÉN, RENVALL e SANDBERG em 1991 utilizaram amplamente parâmetros histológicos em trabalhos que avaliaram cicatrização de anastomoses colônicas, juntamente com outros parâmetros bioquímicos e mecânicos. SOUSA et al. (1991), estudaram alguns dos parâmetros supracitados classificando-os e quantificando-os, de acordo com sua presença e intensidade, em ausente, leve, moderado ou intenso.

Outro método histológico de grande utilidade, principalmente na avaliação e diferenciação de tipos de colágeno é o da polarização com Picrosirius. A coloração de Van Gieson (picrofucsina) foi introduzida nas técnicas histológicas em 1889 e ainda é largamente utilizada (SWEAT, PUCHTLER, ROSENTHAL 1964). Quando o “*Sirius Red*”, um corante ácido e forte, reage com o colágeno, sua birrefringência normal é aumentada devido ao fato de suas moléculas serem acoladas às fibrilas de colágeno de uma maneira que as mesmas fiquem paralelas. O estudo comparativo de órgãos de animais vertebrados por este método determinou uma estreita correlação entre a localização de diferentes cores e intensidades de birrefringência com a distribuição bioquímica dos tipos I, II e III de colágeno, criando a possibilidade de diferenciação tecidual dos mesmos. O colágeno tipo I aparece como fibras espessas, fortemente birrefringentes, de coloração amarelo ou vermelho; já o colágeno do tipo III possui o aspecto de fibras finas, fracamente birrefringentes e de coloração esverdeada (JUNQUEIRA, MONTES e SANCHEZ 1982).

A Densitometria do Colágeno, mediante análise de anastomoses de intestino delgado de ratos, foi utilizada em modelo experimental para avaliação dos efeitos da Nicotina na cicatrização em três períodos de pós-operatório (3º, 7º e 28º) por SKINOVSKY (2000). Os autores PICKERING e BOUGHNER (1990) demonstraram excelente correlação desta técnica com a análise bioquímica da hidroxiprolina na avaliação da presença de fibrose em enxertos cardíacos.

3 MATERIAL E MÉTODO

As normas técnicas utilizadas neste trabalho seguiram as orientações do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES contidas nas Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná de 2000. Utilizou-se a *Nomina Anatomica Veterinaria* de 1975.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), machos, adultos jovens (50-90 dias), com peso médio $174,41 \pm 37,39$ gramas, provenientes do Biotério do TECPAR (Instituto de Tecnologia do Paraná). Os animais foram confinados, em grupos de 6, em caixas de polipropileno forradas com serragem e, durante período de aclimação de 7 dias, receberam água *ad libitum* e ração para ratos (NUVILAB-CR1[®], Nuvital, Curitiba, Paraná). As condições ambientais do laboratório foram: temperatura de 22 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, controlados eletronicamente (Cronomat[®], Mallory do Brasil, São Paulo-SP). Os animais foram mantidos no Laboratório de Cirurgia Experimental da Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde também os procedimentos cirúrgicos foram realizados.

3.1.2 Aminoácidos

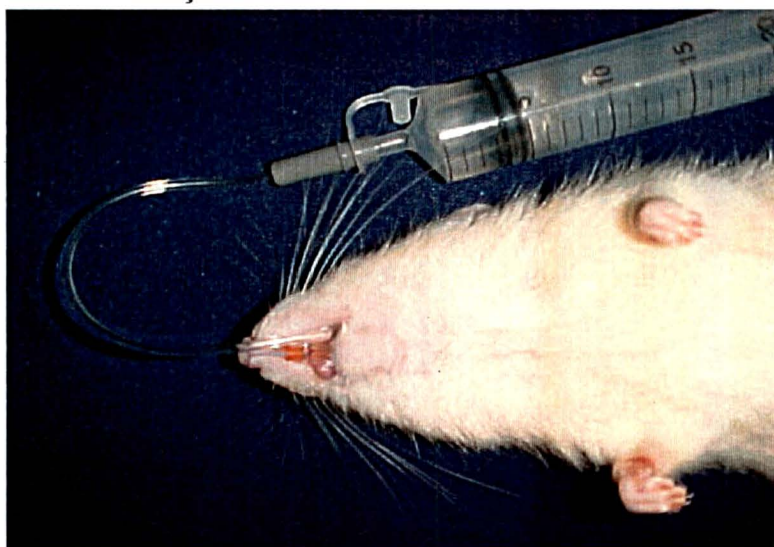
Os aminoácidos utilizados na suplementação da dieta foram a L-Glutamina (Glutamina[®], Ajinomoto Interamericana do Brasil, São Paulo-SP) a 10% na dose de 1,5g/kg/dia e a Glicina (Glicina[®], Ajinomoto Interamericana do Brasil, São Paulo - SP) a 10% na dose de 1,5g/kg/dia.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Grupos de Estudo

Após os 7 dias de aclimação os ratos foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos de acordo com o tipo de dieta que receberiam durante o experimento. Foram acondicionados em gaiolas individuais. Diariamente os animais foram sedados pela inalação de éter etílico comercial, pesados e receberam via sonda orogástrica a suplementação dos aminoácidos (FIGURA 1). A sonda utilizada foi N° 8F, de 10 cm de extensão e 2 mm de diâmetro interno.

FIGURA 1 - ADMINISTRAÇÃO DE AMINOÁCIDO POR SONDA OROGÁSTRICA APÓS SEDAÇÃO COM ÉTER



O grupo GLY – controle isonitrogenado – (n=24) recebeu ração para ratos, água *ad libitum* e suplementação de Glicina a 10% na dose 1,5g/kg/dia, correspondendo ao volume de 2-3,5 ml, injetada em dose única diária através de sonda orogástrica por 6 dias antes do procedimento cirúrgico e no pós-operatório por 2 ou 7 dias conforme o subgrupo.

O grupo GLN – glutamina – (n=24) recebeu ração para ratos, água *ad libitum* e suplementação de L-Glutamina a 10% na dose de 1,5g/kg/dia, correspondendo ao

volume de 2-3,5 ml, injetada em dose única através de sonda orogástrica por 6 dias antes do procedimento cirúrgico e no pós-operatório por 2 ou 7 dias conforme o subgrupo.

Os ratos do grupo controle (GLY) que foram mortos no terceiro dia de pós-operatório foram denominados GLY 3 e os do oitavo dia de pós-operatório foram denominados GLY 8. Da mesma maneira foram denominados os subgrupos do grupo GLN por GLN 3 e GLN 8 conforme a data de morte.

3.2.2 Procedimento Cirúrgico

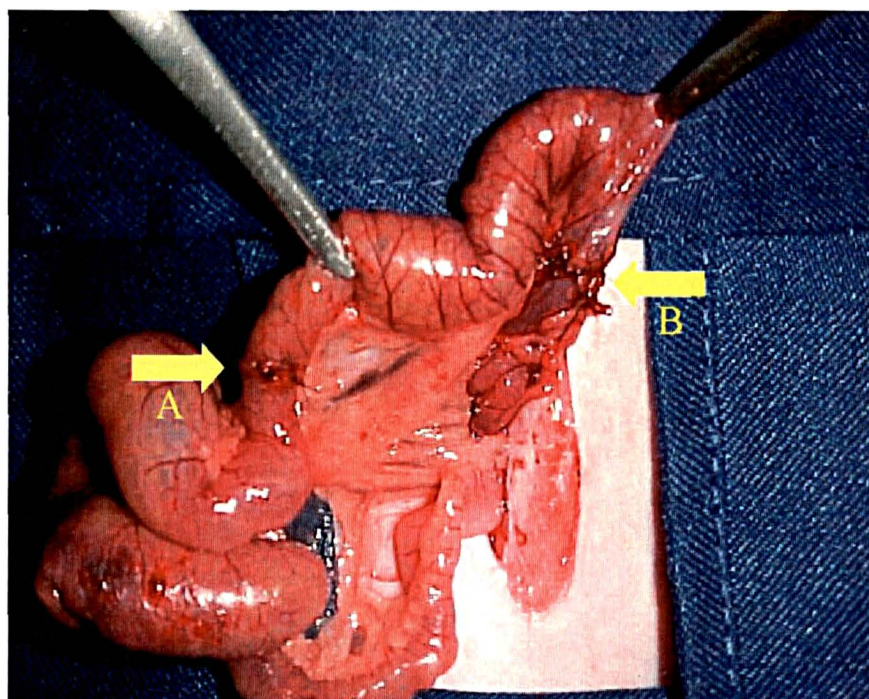
Pré-operatório: todos os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas prévias ao procedimento cirúrgico.[objetivo: diminuir o conteúdo fecal no *intestinum crassum* (intestino grosso) do rato, local onde foram realizadas as anastomoses]

Per-operatório: para a anestesia dos animais foi utilizada a via inalatória com éter etílico comercial em sistema fechado de campânula para indução e semi-aberto (através de cone individual) para manutenção do plano anestésico. Após a anestesia os animais foram pesados. A seguir procedeu-se à tricotomia da *regio abdominis media* (região abdominal média) e posterior fixação do rato à mesa cirúrgica com *membra* (membros) em extensão. Por meio de incisão abdominal mediana de cerca de 3 cm de extensão era obtido acesso ao *cavum abdominis* (cavidade peritoneal) para a exposição do cólon. Procedeu-se então a duas secções completas do cólon, a primeira na *flexura coli dextra* (flexura menor do cólon) a aproximadamente 6 cm distais do *ostium ileale* (válvula íleo-cecal) e a segunda, 5 cm distais à primeira no *colon descendens* (colon distal), atentando para a preservação dos *rami colici* (vasos cólicos). A reconstrução foi realizada mediante anastomose término-terminal em plano único total com 8 pontos separados de fio monofilamentar de nylon 6.0 (FIGURA 2). O fechamento da parede foi feito com sutura contínua ancorada de fio monofilamentar de nylon 3.0 em 2 planos: músculo-aponeurótico e intradérmico.

3.2.3 Pós-Operatório

Após a recuperação anestésica cada animal foi recolocado em sua gaiola de origem, onde voltou a receber, após uma hora do procedimento, água e ração *ad libitum*. No primeiro dia de pós-operatório a administração dos aminoácidos foi reiniciada diariamente no mesmo horário até a morte do animal.

FIGURA 2 - ASPECTO DO CÓLON APÓS REALIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES PROXIMAL (A) E DISTAL (B)



3.2.4 Morte dos Animais

Metade dos ratos de cada grupo foi morta no terceiro dia de pós-operatório e a outra metade no oitavo dia de pós-operatório. Foi utilizada dose letal de éter etílico inalatório. Realizou-se laparotomia mediana para acesso à cavidade abdominal. Na sequência, após inspeção cuidadosa da cavidade e classificação das aderências, procedeu-se à lise parcial destas e à retirada de dois segmentos do cólon, de 5 cm de

extensão cada, contendo as anastomoses proximal e distal em suas porções médias (FIGURA 3). Os dois espécimes cirúrgicos de cada animal (proximal e distal) foram conservados alternadamente em solução salina isotônica e formalina a 10% para estudos de tração computadorizada e para estudo histológico, respectivamente.

FIGURA 3 - SEGMENTO COLÔNICO CONTENDO A ANASTOMOSE EM SUA PORÇÃO MÉDIA



Os animais nos quais a anastomose rompeu fora da linha de sutura, bem como os que evoluíram a óbito durante o experimento foram excluídos de todas avaliações do estudo. Os grupos foram, no final, compostos da seguinte maneira: GLY 3 com 9 animais, GLY 8 com 9 animais, GLN 3 com 9 animais e GLN 8 com 10 animais.

3.2.5 Dados Avaliados

3.2.5.1 Peso

Os ratos tiveram seus pesos aferidos no dia inicial do experimento, isto é, após os sete dias de aclimação no Laboratório de Cirurgia Experimental e diariamente até o dia de morte. A balança eletrônica utilizada para tal aferição estava regulada de acordo com os padrões do INMETRO. Os valores do peso foram mensurados e registrados em gramas. [o ganho ponderal dos animais serviu como método de avaliação nutricional]

O peso diário serviu para orientar a dose de aminoácido a ser administrada. Optou-se por avaliar a variação de peso entre os dias inicial e o da operação, entre os dias da operação e da morte e entre os dias da morte e inicial.

3.2.5.2 Ingesta Alimentar Média

Diariamente em horário pré-determinado, era oferecida a cada animal quantidade fixa de 35 gramas de ração que corresponde a 3 kcal por grama, e cuja constituição está demonstrada no QUADRO 1. A diferença diária entre o peso de ração restante, bem como das perdas ao redor do recipiente e fundo da gaiola e o peso de ração ofertada no dia anterior era anotado e rotulado como ingesta alimentar.

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PARA RATOS

Proteína *	22,00%
Extrato etéreo *	3,00%
Matéria mineral *	9,00%
Matéria fibrosa *	6,00%
Cálcio *	1,40%
Fósforo *	0,70%
Aminoácidos adicionados	
Metionina *	300mg
Lisina *	100mg
Calorias**	3kcal

* Composição por quilograma de ração

** Composição por grama de ração

3.2.5.3 Incidência de Óbitos

Todos os animais que, durante o estudo, evoluíram a óbito, apesar de não serem incluídos na análise estatística dos parâmetros de cicatrização, foram laparotomizados para evidenciação da *causa mortis*.

3.2.5.4 Aderências Intra-Abdominais

Durante a laparotomia inspecionou-se a cavidade abdominal quanto à presença de aderências, que foram quantificadas segundo o índice de *Knighly* (KNIGHTLY 1962) conforme descrito no Quadro 2.

Utilizaram-se para cálculo as médias dos índices de cada subgrupo, sendo estas comparadas apenas entre subgrupos que foram mortos no mesmo dia.

QUADRO 2 – ÍNDICE DE ADERÊNCIAS DE KNIGHTLY

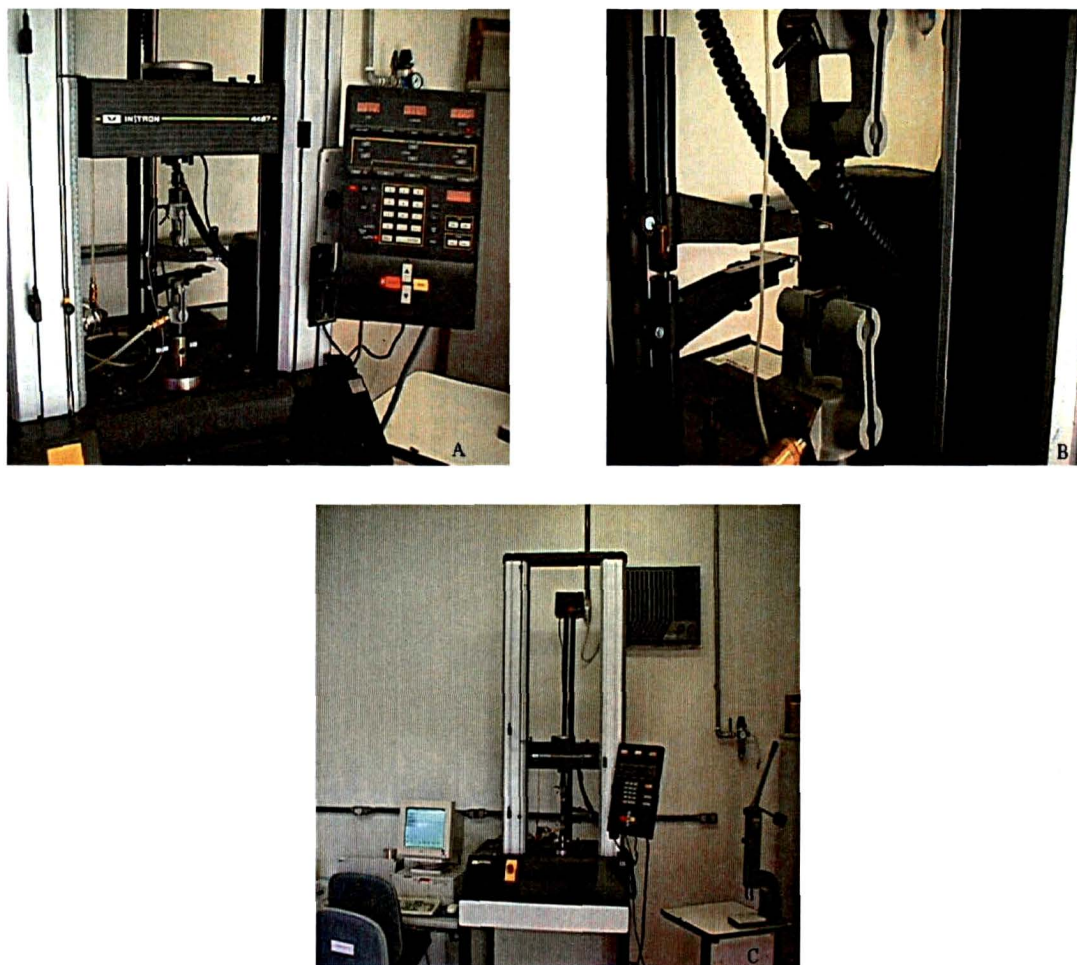
GRAU	DESCRIÇÃO
0	AUSÊNCIA DE ADERÊNCIAS
1	ADERÊNCIA ÚNICA, FINA E FACILMENTE SEPARÁVEL
2	ADERÊNCIAS EM PEQUENA EXTENSÃO, FRACAS E QUE SE ROMPEM COM PEQUENA TRAÇÃO
3	ADERÊNCIAS VISCERAIS EXTENSAS QUE SE ESTENDEM ATÉ A PAREDE
4	ADERÊNCIAS NUMEROSAS, EXTENSAS E DENSAS QUE ENVOLVEM O MESENTÉRIO, INTESTINO, OMENTO E PAREDE ABDOMINAL

3.2.5.5 Força Tênsil de Ruptura da Anastomose Colônica

A avaliação da força de tensão da anastomose foi realizada no laboratório do Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC).

Para avaliação desta variável foi utilizada máquina universal de ensaio mecânico computadorizada, da marca *Instron*, modelo 4467 (*Instron, London, UK*), com garras de pressão pneumática e sistema eletrônico de aquisição de dados com utilização do *software Instron* série IX, versão 7.26.00 (FIGURA 4).

FIGURA 4 - MÁQUINA DE TRAÇÃO COMPUTADORIZADA - INSTRON 4467

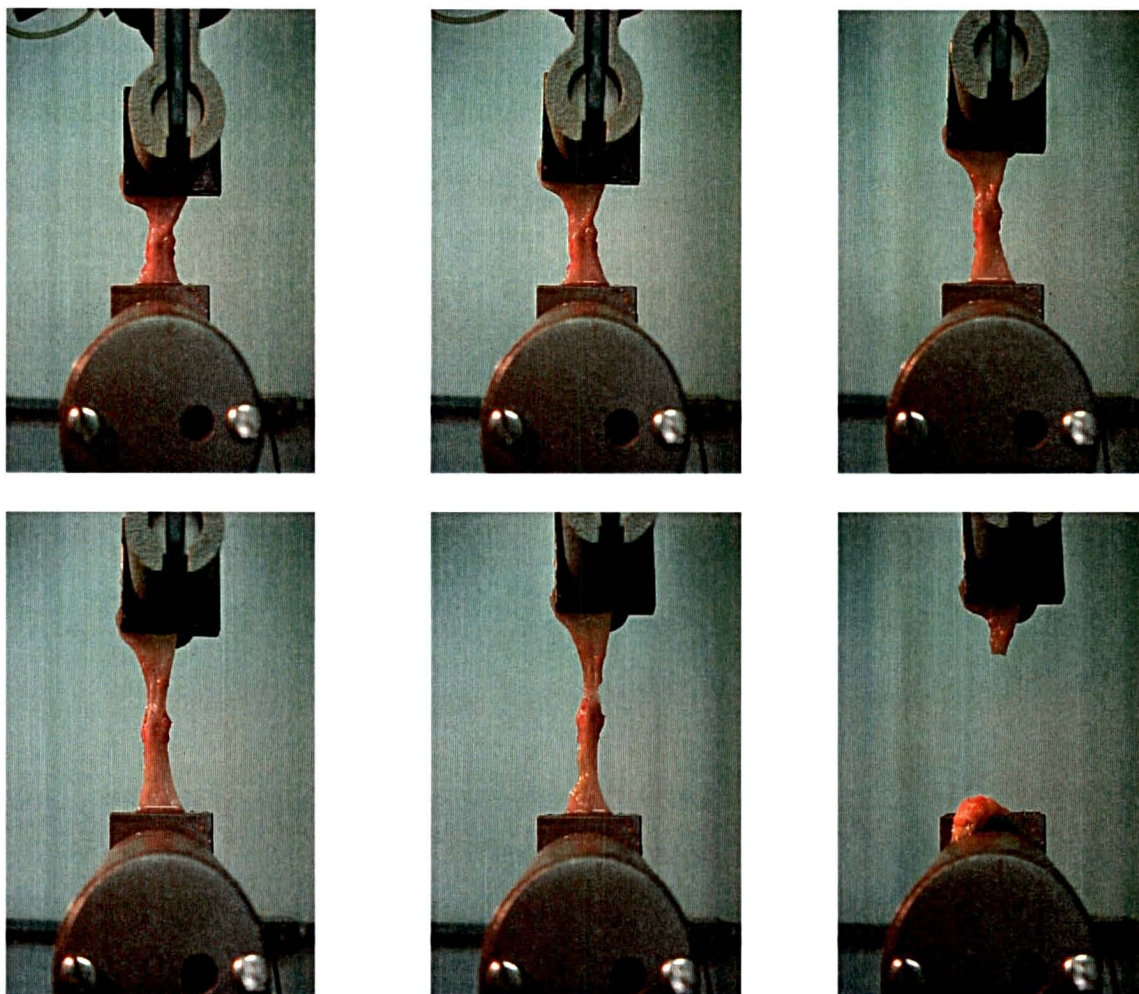


Nota: A - Mostrador do controle de tração. B - Detalhe do conjunto de presilhas para fixação dos corpos de prova. C - No conjunto: instrumento de precisão para tração acoplado ao sistema computadorizado.

O segmento colônico de cada animal, separado para o ensaio de tensão e acondicionado em frascos contendo solução salina a 0,9%, foi fixado com suas extremidades presas às presilhas, contendo a anastomose em sua porção média. Todos os testes de tração foram feitos em um intervalo máximo de 3 horas após a ressecção dos corpos de prova. A tração ocorreu com velocidade de 50 mm/minuto, utilizando-se

uma carga de 10 Kg com sensibilidade de 50 g, com margem de erro de 0,5% até a ruptura total do corpo de prova (FIGURA 5). A força de tração foi constantemente mensurada através do computador anexo ao sistema de presilhas.

FIGURA 5 - ESTUDO DA TRAÇÃO EM CORPO DE PROVA CONTENDO A ANASTOMOSE COLÔNICA EM SUA PORÇÃO MÉDIA



O programa demonstrava um sistema de coordenadas cartesianas cujo eixo x representava a unidade Distância e o eixo y a unidade Força. Inicialmente o gráfico apresentou direção ascendente. No momento da ruptura inicial, o gráfico demonstrou a mudança imediata de direção correspondendo à Força Máxima de Tração (FMT) suportada pelo corpo de prova. Durante a fase descendente do gráfico, a ruptura da peça estava em progressão, até o momento de queda de tensão ao nível zero; este ponto correspondeu à separação total dos cotos colônicos. A última força medida pelo computador, no gráfico, foi denominada Força de Ruptura Total (FRT).

As duas variáveis de força (FMT e FRT) foram submetidas a três análises diferentes. A primeira, comparando-se os animais entre os grupos de uma maneira global: GLY x GLN; a segunda, comparando-se os animais dentro de seus grupos; GLY 3 x GLY 8 e GLN 3 x GLN 8 e na terceira foram comparados os subgrupos em tempos iguais de morte: GLY 3 x GLN 3 e GLY 8 x GLN 8.

3.2.5.6 Avaliação Histológica

Após a obtenção do segmento colônico de cada animal, destinado à análise histológica, as peças cirúrgicas foram abertas em sentido longitudinal, na borda anti-mesentérica, fixadas em formalina a 10% e encaminhadas para o estudo histológico. Secções perpendiculares ao maior eixo da sutura foram efetuadas e encaminhadas para o processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 4 µm de espessura os cortes histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

As secções histológicas coradas foram examinadas em microscópio óptico marca *Olympus*, modelo BH-2, com lentes planas apocromáticas (*Olympus, Tokyo, Japan*). Este método teve o objetivo de avaliar o tipo e quantidade das células predominantes na reação inflamatória (infiltrado polimorfonuclear e monomorfonuclear), presença de edema intersticial, congestão vascular e o grau de formação de tecido de granulação e de fibrose.

Os dados obtidos pela técnica de HE foram classificados em “abundantes”, “moderados”, “discretos” e “ausentes”, de acordo com a intensidade em que foram encontrados, e transformados em variáveis quantitativas através da atribuição de índice aos achados histológicos. A presença de edema, congestão e células neutrofílicas foi indicativa de processo inflamatório agudo. Já a presença de tecido de granulação, fibrose e células monomorfonucleares foi achado determinante de processo inflamatório crônico. Aos índices do processo inflamatório agudo foi atribuído sinal negativo e aos índices de processo inflamatório crônico foi atribuído sinal positivo. A

atribuição dos índices ocorreu como mostra a QUADRO 3. (SOUSA, SOARES E APRILLI, 1991)

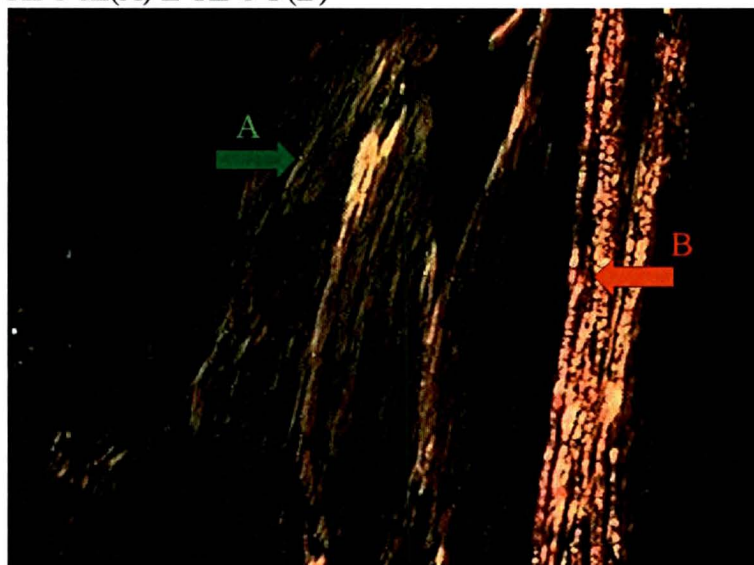
QUADRO 3 - CLASSIFICAÇÃO E ATRIBUIÇÃO DE ÍNDICES AOS ACHADOS HISTOLÓGICOS DE HEMATOXILINA-EOSINA

Achados de HE	Intensidade dos Achados			
	Abundante	Moderado	Discreto	Ausente
Neutrófilos	-3	-2	-1	0
Edema	-3	-2	-1	0
Congestão	-3	-2	-1	0
Monomorfonucleares	3	2	1	0
Tecido de granulação	3	2	1	0
Fibrose	3	2	1	0

Após a atribuição dos índices, procedeu-se à somatória destes, de maneira que cada grupo de animais obteve uma média para cada parâmetro analisado.

Adicionalmente os cortes histológicos foram submetidos à coloração de *picrosirius-red* F3BA para identificação de colágenos maduro e imaturo por técnica de microscopia com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. Nesta técnica analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico da marca *Zeiss*, em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmera *Sony CCD 101* (*Sony, Tokyo, Japan*), transmitidas a um monitor colorido *Trinitron Sony*, congeladas e digitalizadas através de placas *Oculus TCX*. Finalmente, foi realizada a análise das imagens através do aplicativo *Image Pro-plus* versão 4.5 para *Windows* em computador da linha *Pentium*. A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução. No sistema RGB (*Red, Green, Blue*) foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III) FIGURA 6.

FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA (400x) CORADA POR *PICROSIRIUS-RED* ILUSTRANDO OS DOIS SUBTIPOS DE COLÁGENO AVALIADOS: TIPO III(A) E TIPO I (B)



Nos cortes histológicos analisados determinaram-se, sobre a linha de anastomose, três campos distintos: superior, médio e inferior. Calculou-se a percentagem da área ocupada pelas fibras que continham colágeno dos tipos I e III, obtendo-se então as médias aritméticas.

Os achados histológicos foram submetidos a três análises diferentes. A primeira, comparando-se os animais entre os grupos de uma maneira global: GLY x GLN; a segunda, comparando-se os animais dentro de seus grupos; GLY 3 x GLY 8 e GLN 3 x GLN 8 e na terceira foram comparados os subgrupos em tempos iguais de morte: GLY 3 x GLN 3 e GLY 8 x GLN 8.

3.2.6 Análise Estatística

Foi utilizada a probabilidade exata de *Fisher* para avaliação da independência entre os grupos com relação aos óbitos e às rupturas de corpos de prova fora da linha de anastomose. Para as variáveis quantitativas observou-se o pré-requisito da distribuição normal (Gaussiana) das variáveis para a escolha do teste estatístico, sendo que na análise não-paramétrica foram utilizados o teste de *Kruskal-Wallis* para a

avaliação das diferenças das médias das variáveis: índices de aderências e índices de neutrófilos entre os grupos GLY 3 e GLN 3, e o teste t de *Student* para as demais variáveis entre e dentro dos grupos. Algumas variáveis qualitativas foram transformadas em quantitativas pela atribuição de índices, sendo elas: aderências intra-abdominais aferidas pelo índice de *Knighly* e dados histológicos. Estas variáveis foram também submetidas à avaliação das diferenças das médias entre e dentro dos grupos, utilizando as metodologias supracitadas. Para a variável ingesta alimentar optou-se por trabalhar com a ingesta alimentar média (IAM) do início do estudo até o ato operatório e deste até a morte dos animais entre os grupos. Para a variável peso dos animais, além de serem avaliadas as médias de peso inicial, da data da operação e da data da morte, foram utilizadas as variações dos pesos entre os dias da operação e inicial (DPOI), entre os dias da morte e inicial (DPMI) e entre os dias da morte e da operação (DPMO) entre os grupos. Os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro-padrão da média ($M \pm EPM$). Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Dos 24 ratos que receberam o aminoácido Glicina, três foram a óbito; um por depressão respiratória durante uma das administrações de aminoácido sob sedação e outros 2 por deiscência anastomótica e peritonite fecal. Dos 24 ratos do grupo Glutamina, um animal evoluiu a óbito; sendo a causa deiscência com peritonite fecal. Testou-se a hipótese da relação entre e dentro dos grupos de acordo com a incidência de óbitos, não sendo encontrado significância estatística ($p=0,50$).

Com relação à ruptura fora da anastomose, houve total independência intra e entre grupos como demonstrado na TABELA 1.

TABELA 1 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INDEPENDÊNCIA ENTRE OS SUBGRUPOS GLICINA E GLUTAMINA COM RELAÇÃO À RUPTURA DO CORPO DE PROVA FORA DA LINHA DA ANASTOMOSE

SUBGRUPOS	N	RFA	p
GLY 3	12	1	0,50
GLN 3	12	2	
GLY 8	12	2	0,70
GLN 8	12	2	

Nota: RFA – ruptura fora da anastomose, N – nº de animais, p – nível de significância estatística

4.1 PESO

As médias e os erros-padrão da variação peso para cada grupo estão apresentadas na TABELA 2 não sendo encontrada diferença estatística entre os grupos.

TABELA 2 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DOS PESOS DOS GRUPOS GLICINA E GLUTAMINA NOS DIAS INICIAL, DA OPERAÇÃO E DA MORTE

PESO	GLY (N=18)	GLN (N=19)	p
	M ± EPM	M ± EPM	
INICIAL	174,30 ± 43,91	174,51 ± 31,22	0,99
OPERAÇÃO	174,24 ± 35,29	180,09 ± 28,70	0,58
MORTE	182,47 ± 24,59	190,01 ± 16,68	0,28

Nota: N – nº de animais; M – média; EPM – erro padrão da média; p – nível de significância estatística

4.1.1 Variação de Peso

A média das diferenças entre o peso mensurado no dia de morte e o peso inicial de cada animal (DPMI) foi de $-14,68 \pm 24,51$ g para o subgrupo GLY 3 e de $-3,55 \pm 7,35$ g para o subgrupo GLN 3 ($p=0,21$). Para os animais que foram mortos no oitavo dia de pós-operatório o valor da DPMI foi de $31,02 \pm 7,40$ para o subgrupo GLY 8 e de $32,64 \pm 10,44$ para o subgrupo GLN 8 ($p=0,70$). Durante o estudo, os animais mortos no terceiro dia de pós-operatório apresentaram valores negativos (perda de peso) e a média da variação não foi diferente entre os subgrupos. Os subgrupos GLY 8 e GLN 8 apresentaram diferenças de peso positiva, indicando ganho ponderal mas, à semelhança dos animais do terceiro dia de pós-operatório, não houve diferença estatística significativa.

As diferenças de peso entre os dias inicial e da operação (DPOI) e entre os dias da morte e da operação (DPMO) bem como a análise estatística estão demonstradas nas TABELAS 3 e 4, respectivamente.

TABELA 3 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DE PESO ENTRE OS DIAS DA OPERAÇÃO E INICIAL (DPOI) ENTRE OS SUBGRUPOS

SUBGRUPO	N	DPOI (g) (M ± EPM)	p
GLY 3	9	- 8,34 ± 16,99	0,13
GLN 3	9	1,63 ± 7,44	
GLY 8	9	8,22 ± 8,04	0,81
GLN 8	10	9,14 ± 8,35	

Nota: N – nº de animais, M – média, EPM – erro padrão da média, p – nível de significância estatística

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA VARIAÇÃO DE PESO ENTRE OS DIAS DA MORTE E DA OPERAÇÃO (DPMO) ENTRE OS SUBGRUPOS

SUBGRUPO	N	DPMO (g) (M ± EPM)	p
GLY 3	9	-6,35 ± 8,89	0,71
GLN 3	9	-5,18 ± 2,76	
GLY 8	9	22,80 ± 8,80	0,89
GLN 8	10	23,50 ± 12,14	

Nota: N – nº de animais, M – média, EPM – erro padrão da média, p – nível de significância estatística

4.2 INGESTA ALIMENTAR

A média da ingesta alimentar do subgrupo GLY submetido à morte no terceiro dia de pós-operatório durante o período que antecedeu o procedimento cirúrgico foi de $21,29 \pm 4,24$ g; comparando-se ao valor médio de $26,05 \pm 1,72$ g apresentado pelo subgrupo GLN 3 durante o mesmo período podemos notar significância estatística em favor do grupo GLN ($p=0,007$). Nos subgrupos GLY 8 e GLN 8, a diferença não foi

estatisticamente significativa, quando analisada a ingesta alimentar no período pré-operatório com médias de $22,29 \pm 4,24\text{g}$ e $24,60 \pm 5,05\text{g}$, respectivamente ($p = 0,45$).

Com relação à análise da ingesta alimentar no período pós-operatório nos subgrupos, não foi encontrada diferença estatística estando os dados demonstrados na TABELA 5.

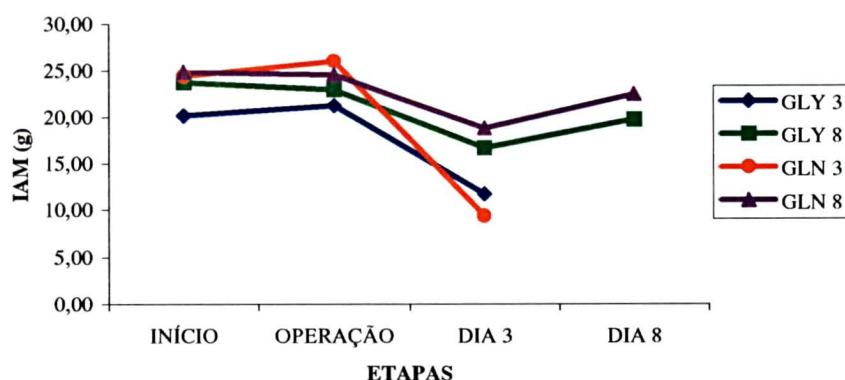
TABELA 5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA INGESTA ALIMENTAR MÉDIA (IAM) DURANTE O PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO NOS SUBGRUPOS

SUBGRUPO	N	IAM (g) (M \pm EPM)	p
GLY 3	9	$11,76 \pm 5,57$	0,33
GLN 3	9	$9,39 \pm 4,39$	
GLY 8	9	$19,74 \pm 3,61$	0,18
GLN 8	10	$22,51 \pm 4,92$	

Nota : N – nº de animais, M – média, EPM – erro padrão da média, p – nível de significância estatística

A evolução das médias de ingesta alimentar durante as diversas etapas do experimento está ilustrada no GRÁFICO 1.

GRÁFICO 1 – EVOLUÇÃO DA INGESTA ALIMENTAR MÉDIA (IAM) DOS SUBGRUPOS GLY 3, GLN 3, GLY 8 e GLN 8 DURANTE O EXPERIMENTO



4.3 ADERÊNCIAS INTRA-ABDOMINAIS

As aderências intra-abdominais tiveram suas médias calculadas e comparadas entre os subgrupos (TABELA 6). As médias dos índices de aderência foram de 1,67 para os subgrupos GLY e GLN submetidos à morte no terceiro dia de pós-operatório, sem diferença estatística ($p=1$). As médias dos subgrupos GLY 8 e GLN 8 foram 1,78 e 1,50 respectivamente sem, também, diferença significativa ($p=0,32$).

TABELA 6 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES DE ADERÊNCIA INTRA-ABDOMINAL NOS SUBGRUPOS

SUBGRUPO	N	ÍNDICES DE ADERÊNCIA (M ± EPM)	p
GLY 3	9	1,67 ± 0,87	1,0
GLN 3	9	1,67 ± 0,87	
GLY 8	9	1,78 ± 0,67	0,32
GLN 8	10	1,50 ± 0,53	

Nota : N – nº de animais, M – Média, EPM – erro padrão da média, p – nível de significância estatística

4.4 FORÇA TÊNSIL DE RUPTURA

A força máxima de tração (FMT) e a força total de ruptura (FRT) foram analisadas de três maneiras diferentes. A primeira constou da divisão dos animais em dois grupos: o GLY e o GLN. Os resultados obtidos, com relação à FMT, foram de $0,142 \pm 0,060$ Kgf no grupo GLY e de $0,164 \pm 0,085$ no grupo que recebeu Glutamina, não sendo a diferença estatisticamente significativa com $p = 0,35$. A FRT foi de $0,042 \pm 0,027$ para o grupo controle e de $0,068 \pm 0,045$ para o grupo Glutamina com

diferença significativa com $p = 0,04$. A Segunda forma de análise considerou os quatro subgrupos de animais conforme a data da morte, nesta última ambas as variáveis de força não apresentaram diferença estatística. Por último foram avaliados entre os subgrupos do mesmo grupo os valores da FMT e da FRT (TABELA 7).

TABELA 7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) E DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS

GRUPO	FMT (kgf) M \pm EPM	p	FRT (kgf) M \pm EPM	P
GLY 3	0,110 \pm 0,031	0,54	0,036 \pm 0,014	0,38
GLN 3	0,120 \pm 0,041		0,045 \pm 0,026	
GLY 8	0,174 \pm 0,066	0,42	0,049 \pm 0,034	0,06
GLN 8	0,206 \pm 0,096		0,089 \pm 0,050	
GLY 3	0,110 \pm 0,031	0,02	0,036 \pm 0,014	0,30
GLY 8	0,174 \pm 0,066		0,049 \pm 0,034	
GLN 3	0,120 \pm 0,041	0,02	0,045 \pm 0,026	0,03
GLN 8	0,206 \pm 0,096		0,089 \pm 0,050	
GLY T (N=18)	0,142 \pm 0,060	0,35	0,042 \pm 0,027	0,04
GLN T (N=19)	0,165 \pm 0,085		0,068 \pm 0,045	

Nota : M – média; EPM – erro padrão da média; p – nível de significância estatística; T – total

Os GRÁFICOS 2 e 3 ilustram os valores da FMT e da FRT.

GRÁFICO 2 - VALORES DA FORÇA MÁXIMA DE TRAÇÃO (FMT) NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS

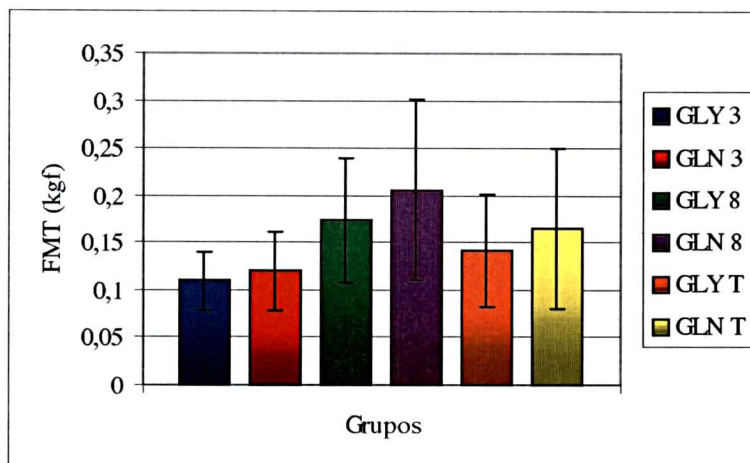
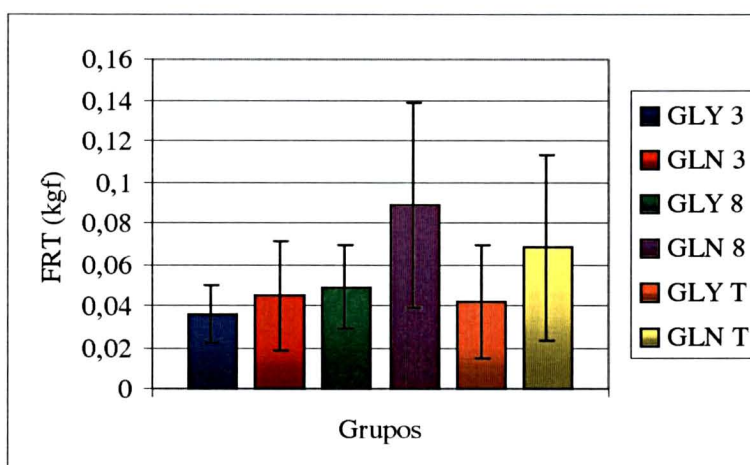


GRÁFICO 3 - VALORES DA FORÇA DE RUPTURA TOTAL (FRT) NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS



4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

4.5.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina

Com relação aos índices de infiltrado neutrofílico (PMN), não houve diferença estatística entre os grupos Glicina, Glutamina e entre os subgrupos. O subgrupo GLY 3 apresentou como média: $-1,78 \pm 0,67$, GLN 3: $-1,78 \pm 0,67$ ($p=1$), GLY 8: $-1,22 \pm$

0,44 e o GLN 8: $-1,30 \pm 0,67$ ($p=0,77$). O índice de infiltrado neutrofilico foi de $-1,50 \pm 0,62$ no grupo Glicina e de $-1,53 \pm 0,70$ para o grupo Glutamina ($p=0,90$).

Os índices de edema (outro parâmetro histológico de processo inflamatório agudo) foram de $-1,33 \pm 0,71$ para o subgrupo GLY 3, de $-1,56 \pm 0,53$ para GLN 3, $-0,56 \pm 0,53$ para GLY 8 e de $-0,90 \pm 0,74$ para GLN 8, não havendo diferença estatística significativa em subgrupos mortos na mesma data ($p=0,46$ e $p=0,26$, respectivamente). Avaliando-se o mesmo parâmetro entre os grupos Glicina e Glutamina também não foi evidenciada significância, com índices de: $-0,94 \pm 0,72$ e de: $-1,21 \pm 0,71$ ($p=0,27$).

Os valores dos índices histológicos indicativos de processo inflamatório agudo estão demonstrados na TABELA 8.

TABELA 8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES HISTOLÓGICOS (HE) DE PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS

GRUPO	PMN	p	EDEMA	p	CONG.	p
	M \pm EPM		M \pm EP		M \pm EPM	
GLY 3	$-1,78 \pm 0,67$	1,0	$-1,33 \pm 0,71$	0,46	$-1,00 \pm 0$	-
GLN 3	$-1,78 \pm 0,67$		$-1,56 \pm 0,53$		$-1,00 \pm 0$	
GLY 8	$-1,22 \pm 0,44$	0,77	$-0,56 \pm 0,53$	0,26	$-0,89 \pm 0,33$	0,96
GLN 8	$-1,30 \pm 0,67$		$-0,90 \pm 0,74$		$-0,90 \pm 0,57$	
GLY 3	$-1,78 \pm 0,67$	0,05	$-1,33 \pm 0,71$	0,02	$-1,00 \pm 0$	0,33
GLY 8	$-1,22 \pm 0,44$		$-0,56 \pm 0,53$		$-0,89 \pm 0,33$	
GLN 3	$-1,78 \pm 0,67$	0,14	$-1,56 \pm 0,53$	0,04	$-1,00 \pm 0$	0,60
GLN 8	$-1,30 \pm 0,67$		$-0,90 \pm 0,74$		$-0,90 \pm 0,57$	
GLY T	$-1,50 \pm 0,62$	0,90	$-0,94 \pm 0,72$	0,27	$-0,94 \pm 0,24$	0,98
GLN T	$-1,53 \pm 0,70$		$-1,21 \pm 0,71$		$-0,95 \pm 0,40$	

Nota: M – média; EPM – erro padrão da média; p – nível de significância estatística; PMN – infiltrado polimorfonuclear; CONG. – congestão vascular; T – total.

Os índices médios do infiltrado monomorfonuclear das anastomoses foram de $1,33 \pm 0,50$ para o subgrupo GLY 3, de $1,00 \pm 0$ para o GLN 3, de $1,00 \pm 0$ para GLY 8 e de $0,90 \pm 0,32$ para GLN 8; não havendo diferença estatística entre eles ($p=0,06$ e $p=0,36$, respectivamente). O índice de infiltrado monomorfonuclear foi significativamente maior no grupo Glicina em relação ao grupo Glutamina ($p=0,04$). Os dados referentes aos índices de processo inflamatório crônico estão demonstrados na TABELA 9.

TABELA 9 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ÍNDICES HISTOLÓGICOS (HE) DE PROCESSO INFLAMATÓRIO CRÔNICO NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS

GRUPO	MMN	p	TEC. GRAN.	p	FIBROSE	p
	M \pm EPM		M \pm EPM		M \pm EPM	
GLY 3	$1,33 \pm 0,50$	0,06	$1,56 \pm 0,53$	1,0	$0,78 \pm 0,44$	0,15
GLN 3	$1,00 \pm 0$		$1,56 \pm 0,53$		$1,00 \pm 0$	
GLY 8	$1,00 \pm 0$	0,36	$2,11 \pm 0,33$	0,17	$2,00 \pm 0$	0,05
GLN 8	$0,90 \pm 0,32$		$1,90 \pm 0,32$		$2,50 \pm 0,71$	
GLY 3	$1,33 \pm 0,50$	0,06	$1,56 \pm 0,53$	0,02	$0,78 \pm 0,44$	0,0000
GLY 8	$1,00 \pm 0$		$2,11 \pm 0,33$		$2,00 \pm 0$	
GLN 3	$1,00 \pm 0$	0,36	$1,56 \pm 0,53$	0,10	$1,00 \pm 0$	0,0000
GLN 8	$0,90 \pm 0,32$		$1,90 \pm 0,32$		$2,50 \pm 0,71$	
GLY T	$1,17 \pm 0,38$	0,04	$1,83 \pm 0,51$	0,55	$1,39 \pm 0,70$	0,15
GLN T	$0,95 \pm 0,23$		$1,74 \pm 0,45$		$1,79 \pm 0,92$	

Nota: M – média; EPM – erro padrão da média; p – nível de significância estatística; MMN – infiltrado monomorfonuclear; TEC. GRAN. – tecido de granulação; T – total.

4.5.2 Densitometria do Colágeno

Com relação ao colágeno do tipo I, a média das áreas percentuais ocupadas pelo mesmo nas anastomoses dos subgrupos GLY 3 e GLN 3 foram respectivamente $41,92 \pm 13,31\%$ e $54,22 \pm 10,02\%$ com $p=0,04$. A diferença estatística significativa na análise deste parâmetro histológico se repetiu quando foram comparados os subgrupos GLY 8 e GLN 8. O primeiro apresentou média de $41,67 \pm 7,69\%$ em comparação com o último de média $62,63 \pm 12,13\%$ ($p=0,0004$). Quando comparados os dois grandes grupos Glicina e Glutamina temos $41,79 \pm 10,54\%$ e $58,65 \pm 11,70\%$ ($p=0,0000$). As áreas anastomóticas ocupadas pelo Colágeno tipo III foram significativamente maiores no grupo GLY, bem como em seus subgrupos GLY 3 e GLY 8 em relação ao grupo GLN e subgrupos GLN 3 e GLN 8. A TABELA 10 mostra a análise da área percentual ocupada pelos tipos I e III de colágeno.

TABELA 10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MÉDIAS DA ÁREA PERCENTUAL OCUPADA PELOS COLÁGENOS TIPO I E III NAS ANASTOMOSES DOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E DOS SUBGRUPOS

GRUPO	COLÁGENO TIPO I (%)	p	COLÁGENO TIPO III (%)	p
	M ± EPM		M ± EPM	
GLY 3	41,92 ± 13,31	0,04	58,04 ± 13,37	0,04
GLN 3	54,22 ± 10,02		45,77 ± 10,02	
GLY 8	41,67 ± 7,69	0,0004	58,14 ± 7,61	0,0003
GLN 8	62,63 ± 12,13		37,16 ± 11,92	
GLY 3	41,92 ± 13,31	0,96	58,04 ± 13,37	0,98
GLY 8	41,67 ± 7,69		58,14 ± 7,61	
GLN 3	54,22 ± 10,02	0,12	45,77 ± 10,02	0,11
GLN 8	62,63 ± 12,13		37,16 ± 11,92	
GLY T (N=18)	41,79 ± 10,54	0,0000	58,09 ± 10,55	0,0000
GLN T (N=19)	58,65 ± 11,70		41,24 ± 11,62	

Nota: M – média; EP – erro padrão da média; p – nível de significância estatística; T – total.

Os valores das áreas percentuais médias ocupadas pelos tipos I e III de colágeno estão ilustradas nos GRÁFICOS 4 e 5.

GRÁFICO 4 - VALORES PERCENTUAIS DAS ÁREAS ANASTOMÓTICAS OCUPADAS PELO COLÁGENO TIPO I NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS

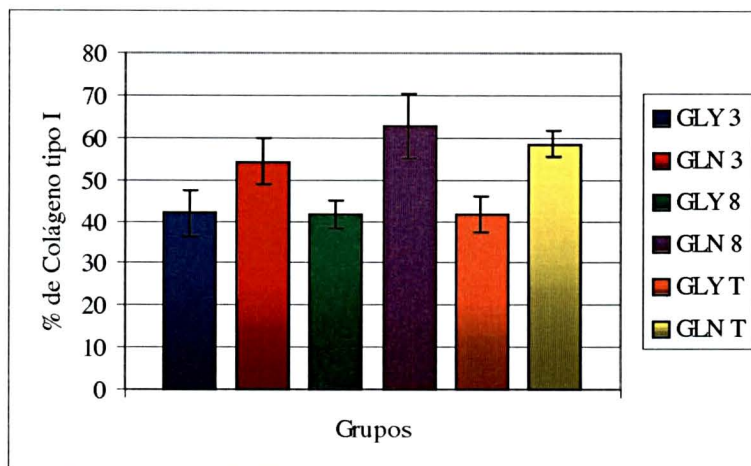
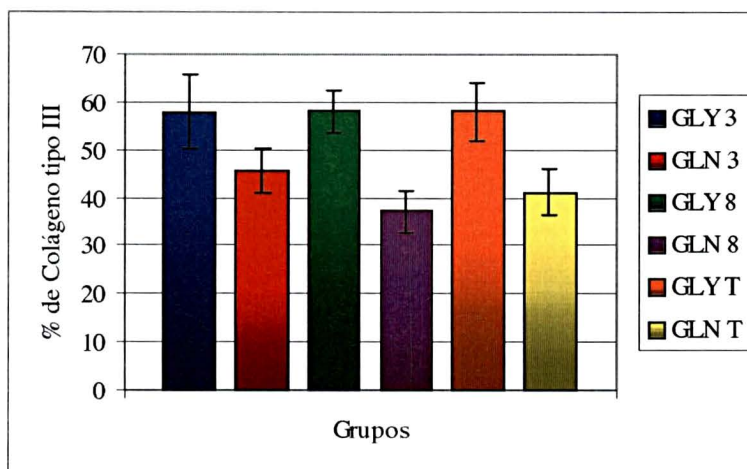


GRÁFICO 5 - VALORES PERCENTUAIS DAS ÁREAS ANASTOMÓTICAS OCUPADAS PELO COLÁGENO TIPO III NOS GRUPOS GLICINA, GLUTAMINA E NOS SUBGRUPOS



5 DISCUSSÃO

Neste estudo, realizaram-se duas anastomoses colônicas término-terminais em cólon de ratos, com o objetivo de avaliar o processo de cicatrização intestinal com suplementação oral de Glutamina e Glicina como controle isonitrogenado, isocalórico e isovolumétrico.

5.1 MODELO EXPERIMENTAL

Vários estudos experimentais avaliando anastomoses intestinais foram realizados com a utilização de murinos (HERMANN et al., 1964; JIBORN et al., 1980; LAW & ELLIS, 1990; McCAULEY et al., 1991). O rato é animal de fácil aquisição, transporte, manipulação e acondicionamento. Além disso, este animal possui regime de alimentação rudimentar, o que permite a introdução de alterações dietéticas com certa facilidade, bem como a análise das variáveis desejadas de maneira simples e objetiva. Existe dificuldade inicial na confecção das anastomoses em estruturas de pequeno diâmetro. Entretanto, após treinamento, as anastomoses são perfeitamente exequíveis sem auxílio de instrumentos de magnificação de imagem e com relativa agilidade. Todas estas vantagens levaram o autor a optar por este modelo animal.

A anestesia é estado de inconsciência induzida. Os três componentes da anestesia são: analgesia (alívio da dor), amnésia (perda da memória) e imobilização. As drogas usadas para atingir a anestesia possuem efeitos variáveis sobre cada um destes campos. Em publicação na Internet (*Guidelines for the use of anesthetics, analgesics and tranquilizers in laboratory animals – research animal resources – University of Minnesota. 2000*), o Éter é classificado como agente inalatório de MAC=3.2, resposta lenta e que apresenta toxicidade hepática moderada. A anestesia inalatória é superior à maioria das formas injetáveis em termos de segurança e eficácia e fácil de ajustar à profundidade anestésica. Os agentes são eliminados do sangue pela

expiração, diminuindo o risco de toxicidade droga-induzida. As desvantagens da anestesia inalatória são os possíveis efeitos nocivos à equipe pesquisadora, principalmente com relação ao estoque e manuseio dos agentes. No animal, o Éter aumenta consideravelmente a quantidade de secreções respiratórias e é irritante para os olhos e mucosa naso-oral. Foi utilizado, no presente estudo, este protocolo de anestesia devido à maior disponibilidade da droga citada e facilidade na indução e manutenção do plano anestésico dos animais.

HALSTED (1887), citado por GETZEN, HOE e HOLLOWAY (1966) opinou que na anastomose término-terminal do intestino, somente um plano de sutura deve ser feito, relatando que a inversão causada pela sutura em 2 planos determina a formação de grande esporão interno, com diminuição da luz intestinal. Alguns estudos relacionaram as anastomoses intestinais construídas com sutura interrompida como produtoras de melhor cicatrização e com menor degradação de colágeno (HOWES, 1929; JIBORN, AHONEN e ZEDERFELDT, 1980).

Fator importante e de grande interferência no processo de cicatrização é o material utilizado na confecção da anastomose: o fio de sutura. Apesar do progresso, ainda não se conhecem todos os fenômenos biológicos envolvidos na cicatrização. A aplicação de fios de sutura interfere nesses fenômenos, daí a busca incessante de material que produza a menor reatividade biológica. Todavia não se chegou ao material ideal. Existem evidências de que os fios monofilamentares inabsorvíveis, tal como os de polipropileno e *nylon*, provoquem menor reação tecidual e, portanto, menor interferência no processo cicatricial (KORUDA & ROLANDELLI, 1990). A utilização do fio monofilamentar de *nylon* 6-0, no presente estudo, é justificada por se desejar mínima reação inflamatória tecidual pela presença do corpo estranho, pois esta poderia interferir no processo de cicatrização ocasionando eventuais erros na análise dos resultados.

De acordo com LINDSTRÖN, ROSENGREN e FORK (1979) o cólon do rato possui de 21 a 27 cm e é dividido em seis partes principais: ceco, cólon proximal, flexura menor, flexura maior, cólon distal e reto (correspondendo, de acordo com à *Nomina Anatomica Veterinaria* à seguinte denominação: *caecum*, *colon ascendens*,

flexura coli dextra, flexura coli sinistra, colon descendens e rectum, respectivamente). Tanto o cólon proximal quanto a flexura menor apresentam padrão macroscópico de sua mucosa semelhante à conformação de folhas de palmeira em contraste com o padrão longitudinal do cólon distal e reto. Além disso a mucosa da flexura menor tende a ser mais espessa em relação às outras regiões do cólon. Como, no presente estudo, foram realizadas duas anastomoses em cada animal em locais teoricamente heterogêneos (flexura menor e cólon distal) utilizou-se o artifício da alternância das peças anastomóticas para análise mecânica e histológica, eliminando assim esta variabilidade.

5.2 UTILIZAÇÃO DA GLUTAMINA

A utilização do aminoácido Glutamina se justifica pelos estudos da última década que investigaram extensivamente o seu papel na manutenção da integridade do tubo intestinal, bem como de sua função reparadora dos intestinos *tenue e crassum* (delgado e grosso) após injúrias diversas (CAMPOS et al., 1994; BARK et al., 1995; GARCIA-ARUMI et al., 1995; ERSIN et al., 2000; SALVALAGGIO, ZENI NETO, TOLAZZI, GASPARETTO, COELHO e CAMPOS, 2002).

Este aminoácido é o combustível oxidativo preferido por todas as células que necessitam de renovação celular rápida e constante. A solução de nutrição parenteral total enriquecida com Glutamina confere índices melhores de cicatrização em anastomoses intestinais quando comparada à nutrição parenteral padrão.

O único estudo que avaliou o efeito da suplementação de Glutamina em cicatrização de anastomoses colônicas em ratos encontrado na literatura foi o de McCAULEY et al., 1991. Estes autores testaram o efeito da Solução Parenteral enriquecida com Glutamina em anastomoses colônicas de ratos desnutridos mediante a análise da Pressão de Ruptura das anastomoses e dosagem do teor de proteína do cólon. O método mecânico utilizado não demonstrou diferenças quando se compararam os grupos Glutamina e Glicina (controle) mas a quantidade de proteína foi significativamente maior no grupo suplementado com GLN. O motivo da ausência

de melhora na cicatrização pode ser justificada justamente pela utilização de modelo experimental com desnutrição prévia. No presente estudo, foi evidenciada diferença nítida na cicatrização das anastomoses colônicas em favor do grupo GLN principalmente pelo aumento percentual da área ocupada pelo colágeno tipo I.

A Glutamina é o aminoácido mais abundante do organismo humano, perfazendo cerca de 60% do “*pool*” de aminoácidos circulantes. Duas enzimas são responsáveis pela sua síntese e degradação: Glutamina sintetase e Glutaminase, respectivamente. Elas são distribuídas heterogeneamente entre os tecidos orgânicos permitindo, desta forma, fluxo inter-órgãos conforme as necessidades específicas de cada tecido. Este aminoácido possui diversas funções, tais como: síntese de nucleotídeos e de proteínas, regulação na produção de amônia renal e regulação do pH sanguíneo. Também funciona como combustível celular para células de alta capacidade de renovação como por exemplo: enterócitos, fibroblastos, colonócitos e linfócitos (SOUBA, SMITH e WILMORE, 1985 e SOUBA, KLIMBERG, PLUMLEY, SALLOUM, FLYNN, BLAND e COPELAND III, 1990). A partir dos estudos de WINDMUELLER & SPAETH, 1977 e 1978; seguidos pelo de HARTMANN & PLAUTH em 1989, onde intestinos de ratos foram perfundidos com soluções preparadas com Glutamina contendo C¹⁴ marcados, observou-se que imediatamente após a perfusão, níveis de dosagem venosa crescentes de amônia e prolina eram observados, este último um substrato importante e necessário à formação, remodelação e maturação das cicatrizes em geral. A associação de suas ações de substrato da síntese protéica e de combustível celular para células de alto “*turnover*” é que justificou seu uso no presente estudo experimental de cicatrização intestinal.

A Glicina é utilizada freqüentemente como agente de comparação à Glutamina (McCAULEY et al., 1991; FOITZYK et al., 1999 e SALVALAGGIO em 2000); já que não apresenta as características fisiológicas e de importância da última, conferindo à dieta o equilíbrio nitrogenado desejado.

A suplementação de aminoácidos por via orogástrica é pouco utilizada na literatura. A preferência da maioria dos autores é de que se proceda à administração destas substâncias diluídas na água ou na ração dos animais (GENNARI,

ALEXANDER e EAVES-PYLES, 1995; BARK et al., 1995; ERSIN et al., 2000) mas esta técnica implica na necessidade de ingestão completa da água ou da ração oferecida para que seja fornecida a dose de aminoácido desejada. Nesse aspecto, o meio utilizado para a administração dos aminoácidos garantiu, no presente estudo, a certeza de ingestão total da dose calculada com o mínimo de complicações. Após estudos da anatomia do rato, foi possível mensurar o comprimento da sonda orogástrica de 8 F necessário para se atingir o *cavum gaster* (cavidade gástrica) do animal. O procedimento de passagem da sonda sob sedação foi aperfeiçoado durante o projeto piloto e o início do estudo e, com a ajuda de um auxiliar para injetar a solução diluída do aminoácido, se chegou a realizá-lo em poucos segundos. Isto evitou um tempo de sedação demasiado e possíveis complicações relacionadas. SALVALAGGIO (2000) utilizou a mesma técnica de administração do aminoácido e não obteve complicações relacionadas ao método.

A maior dificuldade da manipulação e administração da Glutamina, na forma cristalizada, é a sua baixa solubilidade, pois ela precipita-se em poucos segundos quando em solução aquosa. Ao contrário da Glutamina, a Glicina apresenta facilidade em sua diluição pela sua solubilidade em meio aquoso.

Optou-se, no presente estudo, pela administração dos aminoácidos GLY e GLN em dose única diária, mediante sonda orogástrica após sedação inalatória com éter etílico comercial. Entretanto, os riscos inerentes à esta prática diária (depressão respiratória com morte, possível lesões de mucosa oral e intestinal, estresse dos animais) não são desprezíveis, tendo sido observado um óbito no grupo denominado GLY 3 por depressão respiratória durante a sedação.

A dose do aminoácido diferiu da utilizada na literatura (McCAULEY et al., 1991; BARK et al., 1995; GISMONDO et al., 1998), já que as dificuldades de diluição citadas anteriormente se repetem durante a administração da Glutamina. Não há consenso na literatura com relação à dose ideal já que há diversas maneiras de suplementação, tais como: dietas enterais enriquecidas, misturada à ração comum, diluída na água oferecida e através de soluções parenterais. SALVALAGGIO (2000) utilizou a mesma dose e o mesmo método de administração em estudo sobre

translocação bacteriana; não obteve diminuição significativa dos índices de translocação bacteriana, mas observou diminuição significativa do número de culturas bacterianas positivas em órgãos alvo avaliados.

5.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSES INTESTINAIS

O conhecimento em cicatrização intestinal tem avançado consideravelmente e tem-se hoje, compreensão do impacto de vários fatores, locais e sistêmicos, que influenciam o processo cicatricial. Ao contrário da cicatrização cutânea, na qual o progresso pode ser avaliado diariamente (e havendo uma complicação pode ser instituído tratamento precoce), a cicatrização de uma anastomose intestinal não pode ser visualizada. Esta particularidade deixa ao cirurgião apenas os parâmetros de bem estar evolutivo do paciente para julgar o sucesso da operação (THORNTON & BARBUL, 1997). Muito do que se sabe até agora sobre cicatrização foi justamente estudado a nível de pele e extrapolado para outros tecidos. Há particularidades metabólicas inerentes a cada órgão que se refletem em diferentes resultados durante o processo de cicatrização. A dificuldade em se avaliar clinicamente as anastomoses colônicas justifica a necessidade de modelos experimentais que estudem o processo cicatricial no tecido em questão (KORUDA & ROLANDELLI, 1990).

De acordo com HENDRIKS & MASTBOOM (1990), a investigação da cicatrização das anastomoses intestinais com intuito de melhorar seus resultados necessita de maneiras de quantificação. Este processo pode ser baseado em parâmetros clínicos, mecânicos, bioquímicos e histológicos. A preferência é pela utilização de um método mecânico, bioquímico ou de uma combinação dos dois. No presente estudo, optou-se pelo uso de alguns parâmetros clínicos, de um método mecânico, de dois métodos histológicos: Hematoxilina-Eosina (HE) e Densitometria do Colágeno; sendo este último considerado, na atualidade, comparável aos testes bioquímicos (PICKERING e BOUGHNER, 1990).

Os parâmetros clínicos, largamente utilizados na avaliação da evolução das anastomoses intestinais, possuem menor acurácia em relação aos outros parâmetros, sendo considerados apenas adjuvantes nos estudos de cicatrização, principalmente por serem considerados parâmetros subjetivos de avaliação. Invariavelmente não traduzem diferença estatística significativa entre grupos de estudo onde parâmetros bioquímicos ou mecânicos mostram significância (KUZU et al., 1998; VIZZOTTO, 2001). No presente estudo, semelhante aos acima citados não houve diferença na cicatrização entre os grupos quando avaliada sob o prisma clínico de evolução.

O peso tem sido amplamente empregado como parâmetro clínico. KARAHASANOGLU et al. (1998) evidenciaram perda ponderal de aproximadamente 15% do peso corpóreo inicial em ratos alimentados com dieta hipoprotéica por 10 dias antes da realização de anastomose colônica. Com isso encontraram diminuição significativa nas Pressões de Ruptura nas anastomoses dos animais desnutridos. VIZZOTTO (2001) evidenciou perda de peso entre os animais durante estudo da cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de quimioterapia intraperitoneal. Entretanto, não houve correlação com o decréscimo da Força Máxima de Tração ou de Ruptura Total, sugerindo que o fator nutricional pode não ser preponderante no prejuízo da cicatrização das anastomoses colônicas induzido pelo 5-Flourouracil intraperitoneal.

Da mesma forma, no presente estudo, os animais dos subgrupos GLY 3 e GLN 3 apresentaram variação de peso negativa - DPPI (perda ponderal) sem diferença significativa e sem correlação com os parâmetros histológicos e mecânicos. Os subgrupos GLY 8 e GLN 8 apresentaram ganho ponderal, mas sem diferença significativa. Quando analisado o período pré-operatório - DPOI, nota-se que a variação foi negativa no subgrupo GLY 3 em comparação ao valor positivo encontrado subgrupo GLN 3 traduzindo perda e ganho ponderal, respectivamente, porém sem diferença significativa. A explicação para as diferenças de peso nos extremos do estudo entre os subgrupos mortos no terceiro e oitavo dias de PO com relação a variação ponderal seria, provavelmente, a duração do período pós-operatório. Nos primeiros dias a dor decorrente do trauma cirúrgico impede a ingesta alimentar

habitual, o que justifica o ganho ponderal após o terceiro dia. No oitavo dia, a curva de ganho ponderal foi positiva.

Com relação à ingesta alimentar média, houve diferença significativa nos valores da ingesta alimentar média pré-operatória entre os subgrupos GLN 3 e GLY 3 que não pode ser justificada pela ação diferenciada dos aminoácidos, já que o mesmo fato não foi observado entre os subgrupos GLN 8 e GLY 8 durante a fase do estudo que antecedeu a operação. Durante o período pós-operatório não houve diferença estatística entre os subgrupos mortos na mesma data. Dentro dos grupos GLN e GLY as médias de ingesta foram diferentes pelo mesmo motivo discutido na variação do peso.

A mortalidade como consequência da presença de deiscências nas anastomoses colônicas também é medida indireta da deficiência de cicatrização. No presente estudo, quatro animais foram a óbito, sendo três por peritonite fecal e um por depressão respiratória durante administração de AA sob sedação. A incidência de óbitos foi nos primeiros dias após o ato operatório e distribuída de maneira homogênea, não apresentando diferença entre os grupos. Pode se dizer que a grande maioria das deiscências que ocorrem precocemente são decorrentes de falha técnica, sendo assim estes animais podem e devem ser excluídos da avaliação da amostra.

Quando ocorre deiscência há vazamento de conteúdo intestinal dentro da cavidade peritoneal. Para contenção de tal vazamento o organismo responde com bloqueio do local mediante migração de estruturas móveis intra-abdominais e formação de aderências. Os dados obtidos pela quantificação de aderências pelo índice de *Knighly* mostraram uma tendência maior de formação de aderências no subgrupo GLY 8 em relação ao subgrupo GLN 8, porém sem diferença estatística significativa. VIZZOTTO (2001) também não encontrou diferenças quando avaliou anastomoses colônicas realizadas em ratos concomitantemente ao uso de quimioterapia intraperitoneal pelos parâmetros de *Knighly*.

5.4 FORÇA TÊNSIL DE RUPTURA

A força de ruptura tem sido utilizada freqüentemente como método de avaliação da resistência de tecidos em processo de cicatrização, porém apenas recentemente este processo foi proposto como parâmetro mecânico de teste para anastomoses intestinais, como nos trabalhos de NARESSE et al. (1987,1988 e 1993) e LEITE et al. (1993). Por décadas a pressão de ruptura foi considerada o método mecânico de escolha na avaliação de anastomoses intestinais por representar, de forma mais real, o mecanismo fisiopatológico da deiscência intestinal, pela simulação de distensão progressiva no interior das alças intestinais.

Em 1999, IKEUCHI et al., utilizando máquina de ensaio mecânico computadorizado para aferição de tensão, compararam a pressão de ruptura e a força de ruptura à tração, e concluíram que há forte correlação entre estes dois métodos na avaliação da resistência das anastomoses. Este fato ocorreu após o quarto dia de pós-operatório, isto é, passada a fase inicial da cicatrização. A explicação apresentada pela ausência de correlação entre a força tênsil de ruptura e a pressão de ruptura na fase inicial da cicatrização foi a possível falta de homogeneidade na resistência da parede intestinal ao aumento da pressão intraluminal, principalmente na área da anastomose. Esta falta de homogeneidade teria como causa provável a deficiência técnica durante a confecção da anastomose, decorrente, por exemplo, da ausência de tração adequada dos fios de sutura. Deste modo, existiriam áreas de menor coaptação das bordas anastomóticas e, conseqüentemente, de menor resistência à pressão. Outra possibilidade seria o surgimento de áreas de necrose tecidual focal na anastomose, também levando ao surgimento de focos de menor resistência à pressão. Assim, pequenas áreas de menor resistência à pressão na linha da anastomose produziriam diminuição da pressão de ruptura, porém não seriam capazes de produzir diminuição da força de ruptura, pois a maior porção da anastomose permaneceria com boa coaptação e resistência intacta à tração.

Este grupo de autores utilizou uma variável denominada Resistência Tênsil Mínima (RTMI), que foi considerada a primeira queda transitória na curva do gráfico

da tração (significando o princípio de ruptura da anastomose) e propôs que ela seria o melhor meio de se avaliar o poder de contenção de uma anastomose. Tal contenção seria, em última análise, o fator mais eficaz na prevenção de deiscência. Além disso, propuseram também que a RTMI seria a melhor variável para se avaliar a resistência das anastomoses. No presente estudo a RTMI corresponde à FMT e a mudança da nomenclatura se deve ao fato de parecer mais adequado que esta variável signifique a força máxima de tração que a anastomose íntegra pode suportar. A precisão dos dados de força tênsil, obtida mediante utilização de ensaio mecânico computadorizado para aferição da força pelo aparelho Instron (modelo 4467), é um fator a ser destacado neste trabalho, pois são fornecidos índices precisos e confiáveis.

Ocorreram, no presente estudo, rupturas fora da linha anastomótica, durante os testes de tração, em todos os subgrupos. O percentual destas rupturas tende a aumentar quanto mais tardia for a avaliação pós-operatória. O que justifica se escolher as datas de terceiro e oitavo dias de pós-operatório para análise de tração computadorizada. IKEUCHI et al. (1999) obteve praticamente 100% de rupturas na linha anastomótica até o quarto dia de PO, mas nos dias 5, 7 e 14 apenas 54% dos corpos de prova romperam-se na anastomose. No presente estudo, optou-se por desprezar os ratos nos quais os corpos de prova romperam fora da linha anastomótica para análise estatística, pois a inclusão destes animais tornaria a amostra menos homogênea.

Pela análise da Força Máxima de Tração não foi possível evidenciar diferenças significativas entre os grupos GLN e GLY. Com relação à Força de Ruptura Total, o padrão encontrado na variável anterior se repetiu, mas houve diferença significativa na comparação dos grupos, em sua totalidade, em favor do grupo com suplementação da Glutamina. Quando se comparam os subgrupos com animais mortos em diferentes datas dentro do mesmo grupo, pode-se perceber como o método é confiável, pois os dados de força mensurados são significativamente maiores nos animais mortos no 8º dia em relação ao 3º dia de PO. Esta afirmativa é válida com relação à FMT para ambos os grupos e com relação à FRT para o grupo GLN, mostrando a capacidade do método em caracterizar, de modo quantitativo, a evolução da cicatrização das anastomoses colônicas em ratos.

A FRT, como parâmetro isolado de resistência de uma anastomose, não deve ser superestimada pois possui menor sensibilidade em perceber pequenas diferenças em tecidos heterogêneos, como segmentos intestinais. Mas quando suportada por outros parâmetros de avaliação, sejam eles clínicos, mecânicos ou bioquímicos, a Força de Ruptura Total tem seu valor.

5.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A coloração de hematoxilina-eosina permite a caracterização da evolução da cicatrização em anastomoses intestinais mediante diversas variáveis. Existem diversas classificações que se utilizam de números e somatórias para tentar quantificar os parâmetros evolutivos de uma anastomose. A classificação utilizada no presente estudo foi descrita por SOUSA, SOARES E APRILLI, em 1991 e utilizada por VIZZOTTO (2001). Dentre os achados histológicos da hematoxilina-eosina, o único parâmetro que demonstrou diferença significativa foi o índice de infiltrado monomorfonuclear que foi maior no grupo GLY. Este índice é indicador de processo inflamatório crônico. O achado representou indicativo isolado de cicatrização mais avançada no grupo suplementado com o aminoácido Glicina. Este método, quando leva em consideração vários indicadores (agudos e crônicos) avaliados por patologista experiente e imparcial, tem grande valor na avaliação da cicatrização de anastomoses intestinais.

CONSTANTINE e MOWRY (1968), comparando diversos métodos de coloração para análise do colágeno, concluíram ser o corante *picrosirius-red* mais seletivo, simples de executar e de fácil interpretação, sendo ele específico para o estudo do colágeno tecidual, pois a quantidade de corante aderido é proporcional à quantidade da proteína presente, possibilitando o seu uso para a quantificação da mesma (SWEAT, PUTCHTLER e ROSENTHAL, 1964).

É importante salientar a importância da realização dos dois métodos histológicos no mesmo estudo. O colágeno tipo III é depositado cedo nos tecidos e caracteriza um colágeno imaturo. Mais tarde vai aparecendo o colágeno tipo I que é

maduro. A concentração do colágeno em área de cicatriz atinge seu valor mínimo entre 48 e 72 horas e chega a níveis normais ou próximos do normal entre o sétimo e o décimo dia, assim poderíamos dizer que ambos os métodos histológicos possuem a capacidade de graduar a cicatrização como processo inflamatório agudo ou crônico. Os resultados da Densitometria do Colágeno apresentados revelam que, mesmo com a ausência de diferença no processo cicatricial analisado pela coloração de HE, houve maior deposição de colágeno tipo I (maduro) nas anastomoses dos ratos que receberam GLN, demonstrando nitidamente que o processo cicatricial no cólon destes animais se encontrava em fase mais avançada em relação ao grupo Glicina. Este último método histológico não proporcionou análise quantitativa da proteína colágena (como ocorre quando se dosa a hidroxiprolina por métodos bioquímicos), mas qualitativa. A confirmação pode ser evidenciada mediante os valores percentuais das áreas ocupadas pelo colágeno tipo III (imaturo), que foi estatisticamente menor nos ratos que receberam Glutamina.

6 CONCLUSÕES

1. Conclusão Geral: A suplementação oral do aminoácido Glutamina aumenta a resistência à ruptura total de anastomoses colônicas em ratos *Wistar* e aumenta a área percentual ocupada pelo colágeno maduro no 3º e 8º dias de pós-operatório.
2. Conclusões Específicas:
 - a) A Glutamina oral não influencia a cicatrização de anastomoses colônicas pela avaliações do índice de aderências intra-abdominais e da incidência de óbitos.
 - b) A Glutamina oral não altera a Força Máxima de Tração (FMT) entre os grupos, mas aumenta a força necessária à ruptura total (FRT) das anastomoses colônicas.
 - c) Histologicamente, a Glutamina oral associa-se à diminuição do infiltrado monomorfonuclear e a aumento da área percentual ocupada pelo colágeno tipo I (maduro) no 3º e 8º dias de pós-operatório.
 - d) Em ambos os grupos, a Força Máxima de Tração, a Força de Ruptura Total e o índice de Fibrose do 8º dia de PO são maiores do que os do 3º dia de PO. O índice de Edema foi maior no 3º dia de PO.

REFERÊNCIAS

- ACKER, B. A. C.; MEYENFELDT, M. F.; HULST, R. R. W. J.; HULSEWÉ, K. W. E.; WAGENMAKERS, A. J. M.; DEUTZ, N. E. P.; BLAAUW, I.; DEJONG, C. H. C.; KREEL, B. K.; SOETERS, P. B. Glutamine: The pivot of our nitrogen economy? **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.23, n.5, S45-S48, 1999.
- BANDA, M. J.; KNIGHTON, D. R.; HUNT, T. K.; WEBER, Z.. Isolation of a nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.79, p.7773-7777, 1982.
- BARK, T.; KATOULI, M.; LJUNGQUIST, O.; MÖLLBY, R.; SVENBERG, T. Glutamine supplementation does not prevent bacterial translocation after non-lethal haemorrhage in rats. **Eur. J. Surg.**, Linköping, v.161, p.3-8, 1995.
- BLOMQUIST, P.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. The effect of relative bowel rest on healing of colonic anastomoses: Breaking strenght and the collagen in the colonic wall following left colon resection and anastomosis in the rat. **Acta Chir. Scand.**, Oslo, v.150, p.671-675, 1984.
- BRASKEN, P.; LEHTO, M.; RENVALL, S. Fibronectin, laminin, and collagen types I, III, IV and V in the healing of rat colon anastomosis. **Ann. Chir. Gynaecol.**, [SI], v. 79, p.65-71, 1990.
- BRASKÉN, P.; RENVALL, S.; SANDBERG, M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. **Br. J. Surg.**, London, v.78, p.1048-1052, 1991.
- CAMPOS, A. C. L.; MEGUID, M. M.; COELHO, J. C. U. Factors influencing outcome in patients with gastrointestinal fistula. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.76, n.5, p.1191-1198, 1996.
- CAMPOS, F. G.; MUCERINO, D. R.; WAITZBERG, D. L.; LOGULO, A. F.; EL IBRAHIM, R; NADALIN, W.; HABR-GAMA, A. Efeitos protetores da glutamina e dieta elementar na enterocolite actínica aguda: avaliação histológica. **Rev. Ass. Med. Brasil**, São Paulo, v.40, n.3, p.143-149, 1994.
- CARREL, A. The treatment of wounds. **JAMA**, New York, v.55, p.2148-2150, 1910.
- CARRIL, C. S. **Anastomoses intestinais: métodos invaginantes e métodos por aposição em mesmo alinhamento: estudo experimental comparativo com apresentação de um processo original**. Ribeirão Preto, 1970, 75f. Tese (Docência-Livre) Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CHLUMSKY, V. Experimentelle Untersuchungen über die verschiedenen Method der Darmvereinigung. **Burns. Beitr. Klin. Chir.**, Berlin, v.25, p.539-600, 1899.

CONSTANTINE, V. S.; MOWRY, R. W. The selective staining of human dermal collagen. The use of Picrosirius Red F3BA with polarization microscopy. **J. Invest. Derm.**, New York, v.50, n.5, p.419-423, 1968.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S.; DUNPHY, J. E. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.126, p.747-753, 1968.

CRONIN, K.; JACKSON, D. S.; DUNPHY, J. E. Specific activity of hydroxyprolin-tritium in the healing colon. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.126, n.5, p.1061-1065, 1968.

ERBIL, Y.; ÇALIS, A.; BERBER, E.; MERCAN, S. The effect of intraoperative colonic lavage with N^G-nitro-l-arginina methyl ester (L-NAME) on anastomotic healing in the presence of left-sided colonic obstruction in the rat. **Surg. Today**, [SI], v.30, p.421-425, 2000.

ERSIN, S.; TUNCYUREK, P.; ESASSOLAK, M.; ALKANAT, M.; BUKE, C.; YILMAZ, M.; TELEFONCU, A.; KOSE, T. The prophylatic and therapeutic effects of glutamine- and arginine- enriched diets on radiation-induced enteritis in rats. **J. Surg. Res.**, Mariland, v.89, p.121-125, 2000.

FARHAT, S. M.; AMER, N.S.; WEEKS, D.S.; MUSSELMAN, M. M. Effect of mechlorethamine (nitrogen mustard) on healing of abdominal wounds. **Arch. Surg.**, Boston, v.76, p.749-753, 1958.

FOITZIK, T.; KRUSHEVSKI, M.; KROESEN, A. J.; HOTZ, H.G.; EIBL, G.; BUHR, H.J. Does glutamine reduce bacterial translocation? A study model in two animals with impaired gut barrier. **Int. J. Colorectal Dis.**, [SI], v.14, p.143-149, 1999.

GARCIA-ARUMI, E.; SCHWARTZ, S.; LOPEZ-HELLIN, J.; ARBOS, M. A.; ANDREU, A. L.; FARRIOL, M. Addition of glutamine does not improve protein synthesis and jejunal mucosa morphology in non-hypercatabolic stress. **Physiol. Res.**, [SI], v.44, p.233-239, 1995.

GARCIA-OLMO, D.; PAYA, J.; GARCIA-OLMO, D.C. Role of immediate postoperative feeding on colonic anastomoses resistance. An experimental study in a rat model. **Nutr. Hosp.**, [SI], v. 11, n.5, p.279-285, 1996.

GENNARI, R.; ALEXANDER, J. W.; EAVES-PYLES, T. Effect of different combinations of dietary additives on bacterial translocation and survival in gut derived sepsis. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.19, n.4, p.319-325, 1995.

GETZEN, L.C.; ROE, R.D.; HOLLOWAY, C.K. Comparative study of intestinal anastomotic healing in inverted and everted closures. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, p.1219-1227, 1966.

GISMONDO, M. R.; DRAGO, L.; FASSINA, M. C.; VAGHI, I.; ABBIATI, R.; GROSSI, E.; Immunostimulating effect of oral glutamine. **Dig. Dis. Sciences**, Pittsburgh, v.43, n.8, p.1752-1754, 1998.

HARTMANN, F.; PLAUTH, M. Intestinal glutamine metabolism. **Metabolism**, Philadelphia, v.38, n.8, p.18-24, 1989.

HENDRIKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental intestinal anastomosis: parameters for repair. **Dis. Colon Rectum**, Boston, v.33, p.891-901, 1990.

HERMANN, J. B.; WOODWARD, S.C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomosis in the rat. **Surg. Gynecol. Obstet.**, New York, v.119, p.269-275, 1964.

HOWES, E. L.; SOOY, J. W.; HARVEY, S.C. The healing of wounds determined by their tensile strenght. **JAMA**, New York, v.92, p.42-45, 1929.

IKEUCHI, D.; ONODERA, H.; AUNG, T.; KAN, S.; KAWAMOTO, K.; IMAMURA, M.; MAETANI, S. Correlation of tensile strenght with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. **Dig. Surg.**, Basel, v.16, p.478-485, 1999.

JIBORN, H.; AHONEN, J.; ZEDERFELDT, B. Healing of experimental colonic anastomoses IV. Effect of suture technique on collagen metabolism in the colonic wall. **Am. J. Surg.**, New York, v.139, p.406-413, 1980.

JONSSON, K.; JIBORN, H.; ZEDERFELDT, B. Breaking strenght of small intestine anastomoses. **Am. J. Surg.**, New York, v.145, p.800-803, 1983.

JULIANO, R.L.; HASKILL, S. Signal transduction from the extracelular matrix. **J. Cell Biol.**, [SI], v.120, p.577, 1993.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, [SI], v.74, p.153-156, 1982.

KARAHASANOGLU, T.; ALTINLI, E.; HAMZAOGLU, M.; PAKSOY, M.; YESILDERE, T.; ALEMDAROGLU, K. Effect of growth hormone treatment on the healing of the left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. **Br. J. Surg.**, London, v. 85, p. 931-33, 1998.

KORUDA, M. J.; ROLANDELLI, R. H. Experimental studies on the healing of colonic anastomosis. **J. Surg. Res.**, Mariland, v.48, p.504-515, 1990.

KNIGHTLY, J.J.; AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The effect of fibrinolysin and heparin on the formation of peritoneal adhesions. **Surgery**, Philadelphia, v.52, p.250-258, 1962.

KUZU, M.A.; KOSKOY, C.; KALE, T.; DEMIPRENÇE, E.; RENDA, N. Experimental study of the effect of prooperative 5-fluorouracil on the integrity of colonic anastomoses. **Br. J. Surg.**, London, v.85, p.236-239, 1998.

LAW, N.W.; ELLIS, H. The effect of parenteral nutrition on the healing of abdominal wall wounds and colonic anastomosis in protein-malnourished rats. **Surgery**, Philadelphia, v.107, n.4, p.449-454, 1990.

LEITE, C.V.S.; NARESSE, L.E.; KOBAYASI, S.; MINOSSI, J.G.; BURINI, R.C.; CURI, P.R.; HOSSNE, W.S. Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon distal no rato. Estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.8, n.4, p.145-150, 1993.

LINDSTRÖM, C. G.; ROSENGREN, J. E.; FORK, F. T. Colon of the rat; an anatomic, histologic and radiographic investigation. **Acta Radiol. Diag.**, [SI], v.20, p.523-536, 1979.

MARTINS Jr, A.; GUIMARÃES, A. S.; FERREIRA, A. L. Efeitos dos corticosteróides na cicatrização de anastomoses intestinais. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.7, p.28-30, 1993.

McCAULEY, R.; KONG, S. E.; HALL, J. Glutamine and nucleotide metabolism within enterocytes. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.22, n.2, p.105-111, 1998.

McCAULEY, R.; PLATELL, C.; HALL, J.; McCULLOCH, R. Effects of glutamine infusion on colonic anastomotic strength in the rat. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.15, n.4, p.437-439, 1991.

NARESSE, L.E.; LEITE, C.V.S.; RODRIGUES, M.A.M.; ANGELELI, A.Y.O.; MINOSSI, J.G.; KOBAYASI, S. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato. Avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.8, n.2, p.48-53, 1993.

NARESSE, L. E.; LUCCHIARI, P. H.; ANGELELI, A.Y. O.; BURINI, R. C.; RODRIGUES, M. A. M.; CURI, P. R.; KOBAYASI, S. Estudo comparativo de anastomoses no intestino delgado de cão: estudos da força de ruptura, hidroxiprolina tecidual e anatomopatológico. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.3, p.106-112, 1988.

NARESSE, L. E.; LUCCHIARI, P. H.; KOBAYASI, S. Estudo da resistência (força de ruptura) das anastomoses intestinais em plano único e em dois planos. **Rev. Bras. Cir.**, v.78, n.4, p.247-250, 1988.

NARESSE, L. E.; MENDES, E.F.; CURI, P. R.; LUCCHIARI, P. H.; KOBAYASI, S. Aparelho para medida da força de ruptura das anastomoses intestinais. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, São Paulo, v.42, p.204-208, 1987.

NELSEN, T. S.; ANDRES, C.J. Dynamic aspects of small intestine rupture intestine with special consideration of anastomotic strenght. **Arch. Surg.**, Boston, v.22, p.227-239, 1974.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Crit. Care Med.**, New York, v.16, p.889-907, 1988.

PAPACONSTANTINO, H.T.; HWANG, K. O.; RAJARAMAN, S.; HELLMICH, M. R.; TOWNSEND, C. M.; KO, T. C. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. **Surgery**, Philadelphia, v.124, n.2, p.152-160, 1998.

PICKERING, J. G.; BOUGHNER, D. R. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. **Circulation**, Dallas, v.81, n.3, p.949-957, 1990.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I.; TUDERMAN, L.; GUZMAN, N.A. The biosynthesis of collagen and its disorders. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.301, n.1, p.313-323, 1979.

RABAU, M.; EYAL, A.; KLUGER, Y.; DAYAN, D. Bursting pressure in anastomotic healing in experimentally induced colitis in rats. **Dis. Colon Rectum**, Boston, v.41, n.4, p.468-472, 1998.

ROCHA, J. J. R. **Estudo comparativo entre sutura contínua e sutura com pontos separados em anastomoses colo-cólicas em plano único: trabalho experimental em cães.** Ribeirão Preto, 1989. 113f. Tese (Doutorado) - Faculdade Médica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

ROLANDELLI, R.H.; KORUDA, M.J.; SETTLE, R.G.; ROMBEAU, J.L. The effect of enteral feedings supplemented with pectin on the healing of colonic anastomoses in the rat. **Surgery**, Philadelphia, v.99, n.6, p.703-707, 1986.

RUDOLPH, R.; VAN DER BERG, J.; EHRLICH, H.P. Wound contraction and scar contracture. In: COHEN, K.; DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. **Wound healing, biochemical and clinical aspects**. Philadelphia: WB Saunders, 1992. P.96.

SALVALAGGIO, P. R. O. **Efeito da glutamina sobre a translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal**. Curitiba, 2000. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SALVALAGGIO, P.R.O.; ZENI NETO, C.; TOLAZZI, A.R.D.; GASPARETTO, E.L.; COELHO, J.C.U.; CAMPOS, A.C.L. Oral glutamine does not prevent bacterial translocation in rats subjected to intestinal obstruction and *Escherichia coli* challenge but reduces systemic bacterial spread. **Nutrition**, Syracuse, v.18, n.4, p.334-337, 2002.

SCHEPPACH, W.; LOGES, C.; BARTRAM, P.; CHRISTL, S. U.; RICHTER, F. Effect of free glutamine and alanyl-glutamine dipeptide on mucosal proliferation of the human ileum and colon. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.107, p.429-434, 1994.

SKINOVSKY, J. **A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos**. Curitiba, 2000. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SMITH, R. J. Glutamine metabolism and its physiologic importance. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.14, n.4, p.40S-44S, 1990.

SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; AUSTGEN, T. R.; CHEN, M.K.; SALLOUM, R. M. Glutamine nutrition: Theoretical considerations and therapeutic impact. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.14, n.5, Supplement, p.S237-S243, 1990.

SOUBA, W. W.; HERSKOWITZ, K.; KLIMBERG, V. S.; SALLOUM, R. M.; PLUMLEY, D. A.; FLYNN, T. C.; COPELAND III, E. M. The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.211, n.5, p.543-551, 1990.

SOUBA, W. W.; KLIMBERG, S.; PLUMLEY, D. A.; SALLOUM, R. M.; FLYNN, T. C.; BLAND, K. I.; COPELAND III, E. M. The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. **J. Surg. Res.**, Mariland, v.48, p.393-391, 1990.

SOUBA, W. W.; SMITH, R. J.; WILMORE, D. W. Glutamine metabolism by the intestinal tract. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Baltimore, v.9, n.5, p.608-617, 1985.

SOUSA, J. B.; SOARES, E. G.; APRILLI, F. Effects of diclofenac sodium on intestinal anastomotic healing: experimental study on the small intestine of rabbits. **Dis. Col. Rec.**, Boston, v.34, p.13-17, 1991.

STOOP, M. J.; DIRKSEN, R.; HENDRIKS, T. Advanced age alone does not suppress anastomotic healing in the intestine. **Surgery**, Philadelphia, v.119, n.1, p.15-19, 1996.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, S. I.; Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Arch. Pathol.**, Chicago, v. 78, p.69-72, 1964.

THORNTON, F. J.; BARBUL, A. Healing in the gastrointestinal tract. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.77, n.3, p.549-573, 1997.

TORRES, J. M. S. **Efeitos da L-alanil-Glutamina sobre as concentrações *in vivo* de metabólitos em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão.** Fortaleza, 2002. 75f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

UNIVERSITY OF MINNESOTA. **Guidelines for the use of anesthetics, analgesics and tranquilizers in laboratory animals – research animal resources** . Disponível em: www.ahc.umn.edu/rar/anesthesia.html#top>

VAN DER HAMM, A. C.; KORT, W.; WEIJMA, I.; VAN DEN INHG, H.; JEECKEL, H. Effect of antibiotics and fibrin selant on healing colonic anastomoses in the rat. **Br. J. Surg.**, London, v.79, p.525-528, 1992.

VIZZOTTO Jr, A.O. **Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos testada pela força de resistência à tração.** Curitiba, 2001. 91f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

WAHL, L.M.; WAHL, S.M. Inflammation. In: _____. **Wound Healing, Biochemical and Clinical Aspects.** Philadelphia: WB Saunders, 1992. p.40.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v. 77, n.3, p.509-527, 1997.

WILMORE, D. W. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. **J. Nutr.**, [SI], v.131, S.9, p.2543-2549, 2001.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Identification of ketone bodies and glutamine as the major respiratory fuels in vivo for postabsorptive rat small intestine. **J. Biol. Chem.**, [SI], v.253, n.1, p.69-76, 1978.

WINDMUELLER, H. G.; SPAETH, A. E. Vascular perfusion of rat small intestine: metabolic studies with isolated and in situ preparations. **Fed. Proc.**, [SI], v.36, n.2, p.177-181, 1977.

ANEXO

GRUPO	DPOI	DPMO	DPMI	IAM PRE	IAM POS	KNIGHTLY	FMT(kgf)	FRT(kgf)	NEUT.HE	EDEM.HE	CONG.HE	MMN HE	TEC.GRAN.HE	FIBR.HE	%C. TIPO I	%C. TIPO III
GLY 3	-14,35	-6,75	-21,1	14,72	13,32	1	0,102	0,064	-2	-1	-1	1	2	1	37,99	61,99
GLY 3	-16,44	-4,01	-20,45	22,73	20,45	3	0,1	0,043	-3	-1	-1	1	1	0	53,57	46,41
GLY 3	-44,84	-27,1	-71,94	15,76	16,92	2	0,066	0,037	-1	0	-1	2	1	1	21,7	78,28
GLY 3	-17,17	-0,27	-17,44	21,05	16,59	1	0,108	0,029	-1	-2	-1	1	2	1	32,97	67,02
GLY 3	5,67	-5,72	-0,05	22,19	7,33	1	0,111	0,037	-1	-2	-1	2	2	1	28,96	71,03
GLY 3	9,99	4,11	14,1	24,74	9,63	3	0,074	0,039	-2	-2	-1	1	2	1	46,48	53,91
GLY 3	10,11	-3,41	-2,3	24,24	5,58	2	0,141	0,026	-2	-2	-1	1	2	1	54,96	45,03
GLY 3	-2,65	-11,39	-14,04	18,56	4,16	1	0,115	0,01	-2	-1	-1	1	1	1	62,51	37,47
GLY 3	3,58	-2,45	1,13	27,56	11,86	1	0,169	0,037	-2	-1	-1	2	1	0	38,78	61,2
GLN 3	-1,28	-5,97	-7,25	26,11	9,1	2	0,079	0,03	-2	-2	-1	1	1	1	67,54	32,44
GLN 3	-11,44	-2,07	-13,51	24,73	19,09	1	0,136	0,083	-2	-2	-1	1	2	1	58,87	41,11
GLN 3	-5,8	-6,6	-12,4	22,47	11,67	1	0,073	0,04	-1	-1	-1	1	2	1	36,19	63,8
GLN 3	7,1	-9,29	-2,19	26,59	6,41	3	0,094	0,036	-1	-1	-1	1	1	1	47,91	52,07
GLN 3	4,4	-7	-2,6	26,03	4,52	1	0,175	0,062	-2	-2	-1	1	2	1	64,37	35,62
GLN 3	3,73	-3,05	0,68	26,7	10,12	3	0,125	0,078	-2	-1	-1	1	1	1	54,68	45,31
GLN 3	2,1	-7,62	-5,52	28,86	7,83	1	0,16	0,02	-2	-2	-1	1	2	1	43,5	56,48
GLN 3	1,33	-1,17	0,16	26,39	5,17	2	0,075	0,049	-1	-1	-1	1	1	1	57,43	42,56
GLN 3	14,51	-3,81	10,7	26,55	10,59	1	0,165	0,005	-3	-2	-1	1	2	1	57,48	42,5

Contin.																
GLY 8	-2,76	32,34	29,58	24,53	23,1	2	0,158	0,092	-1	0	-1	1	3	2	44,48	55,5
GLY 8	-23	31,56	8,56	22,95	25,06	2	0,152	0,016	-1	-1	-1	1	2	2	51,51	48,48
GLY 8	11,25	17,64	28,89	26,76	23,7	2	0,293	0,088	-1	0	-1	1	2	2	43,03	56,99
GLY 8	16,35	15,65	32	27,57	19,74	1	0,257	0,092	-2	0	-1	1	2	2	39,98	61
GLY 8	15,4	9,3	24,7	24,65	17,38	3	0,167	0,057	-1	1	-1	1	2	2	40,88	59,11
GLY 8	19,8	24,91	44,71	25,66	18,39	2	0,066	0,045	-1	0	0	1	2	2	38,05	60,27
GLY 8	6,45	30,35	36,8	19,1	18,33	2	0,14	0,021	-2	-1	-1	1	2	2	51,5	48,48
GLY 8	4,88	13,72	18,6	15,24	13,59	1	0,175	0,011	-1	-1	-1	1	2	2	25,92	74,06
GLY 8	4,89	29,71	34,6	20,33	18,32	1	0,161	0,019	-1	-1	-1	1	2	2	40,68	59,3
GLN 8	20,38	23,8	44,18	28,29	25,41	1	0,202	0,132	-1	-1	-1	1	2	3	49,49	50,5
GLN 8	0,02	41,04	41,06	29,11	27,02	2	0,206	0,174	-1	0	-1	1	2	3	68,69	31,29
GLN 8	10,21	27,59	37,8	32,52	28,98	1	0,113	0,079	-1	0	0	1	2	3	62,8	37,19
GLN 8	0,6	35,8	36,4	18,87	17,07	1	0,109	0,057	-2	-1	-1	1	2	3	50,09	47,89
GLN 8	-2,56	27,26	24,7	18,65	19,31	2	0,14	0,02	-1	-1	-1	1	2	2	69,96	30,02
GLN 8	8,62	19,48	28,1	18,57	17,73	2	0,254	0,035	-1	0	0	1	2	3	49,24	50,75
GLN 8	18,76	-3,26	15,5	21,96	16,98	2	0,131	0,103	-3	-2	-2	0	1	1	59,2	40,78
GLN 8	18,34	27,32	45,66	23,07	23,12	2	0,417	0,149	-1	-1	-1	1	2	2	56,39	43,59
GLN 8	12,3	21,75	34,05	28,53	28,35	1	0,194	0,068	-1	-1	-1	1	2	3	85,55	14,44
GLN 8	4,76	14,22	19,98	26,56	20,17	1	0,291	0,074	-1	-2	-1	1	2	2	74,88	25,11

NOTA:

GLY 3 – Subgrupo controle isonitrogenado com Glicina morto no 3º PO ; GLN 3 – Subgrupo Glutamina morto no 3º PO

GLY 8 – Subgrupo controle isonitrogenado com Glicina morto no 8º PO ; GLN 8 – Subgrupo Glutamina morto no 8º PO

DPOI – Variação de peso entre operação e início ; DPMO – Variação de peso entre morte e operação

DPMI – Variação de peso entre morte e início ; IAM PRE – Ingesta alimentar média no pré-operatório

IAM POS – Ingesta alimentar média no pós-operatório ; KNIGHTLY – índice de aderência intra-abdominal

FMT (kgf) – Força Máxima de Tração ; FRT (kgf) – Força de Ruptura Total

NEUT.HE – Índice de infiltrado neutrofílico ; EDEM.HE – Índice de edema

CONG.HE – Índice de congestão vascular ; MMN HE – Índice de infiltrado monomorfonuclear

TEC.GRAN.HE – Índice de tecido de granulação ; FIBR.HE – Índice de fibrose

%C.TIPO I – área percentual ocupada pelo colágeno tipo I ; %C.TIPO III – área percentual ocupada pelo colágeno tipo III